

PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

ROBERT CHAMBERS
NEW YORK

NOBURÔ KAMIYA
OSAKA

SIEGFRIED STRUGGER
MÜNSTER

HERAUSGEGEBEN VON

JOSEF SPEK
ROSTOCK

FRIEDL WEBER
GRAZ

KARL HÖFLER
WIEN

BAND. XLV, HEFT 4 (SCHLUSSHEFT)
MIT 54 TEXTABBILDUNGEN
ABGESCHLOSSEN AM 14. FEBRUAR 1956



WIEN
SPRINGER-VERLAG
1956

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint zwanglos in einem berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 650 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung. Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

Prof. Dr. Fr. Weber, Pflanzenphysiologisches Institut, Graz, Schubertstraße 51, Österreich, oder

Prof. Dr. J. Speck, Zoologisches Institut, (4a) Rostock, Universitätsplatz, DDR, oder

Prof. Dr. K. Höfler, Pflanzenphysiologisches Institut, Wien I, Dr.-Karl-Lueger-Ring 1, Österreich

zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag in Wien I, Mölkerbastei 6

Fernsprecher: U 26-5-60 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien.

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen, die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschreiten die Autorkorrekturen 10% der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfähig abgeliefert werden. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Farbige Abbildungen können nur auf Kosten des Autors angefertigt werden. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist im Interesse der Benutzer der Zeitschrift ein Kostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen im allgemeinen den Umfang von 1½ Druckbogen (24 Seiten) nicht überschreiten.

„Vorläufige Mitteilungen“ und Auseinandersetzungen polemischen Inhalts werden nicht angenommen. Grundsätzlich werden nur Arbeiten aufgenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. a. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen. Die Autoren erhalten 100 Separata ihrer Arbeit kostenlos und können maximal weitere 100 Separata zum angemessenen Preis beziehen. Die Bestellung muß mit dem dem Fahnenabzug beigelegten Bestellzettel bei der Rücksendung der korrigierten Fahnen erfolgen.

Unkostenersatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

Der Verlag

XLV. Band

Inhaltsverzeichnis

4. Heft

Abhandlungen

Seite

Kamiya, N.: In memoriam William Seifriz	513
Bairati, A., and F. E. Lehmann: Structural and Chemical Properties of the Contractile vacuole of <i>Amoeba proteus</i>	525
Strügger, S., und M. Losada-Villasante: Die Plastiden in den albicaten Geweben der Blätter einer mediovariegaten Form von <i>Chlorophytum comosum</i>	540
Currier, H. B., and S. Strügger: Aniline Blue and Fluorescence Microscopy of Callose in Bulb Scales of <i>Allium cepa</i> L.	552
Kaho, H.: Untersuchungen über die antagonistische Wirkung von Mono- und Disacchariden und chemisch nahestehenden Stoffen bei der Wirkung einiger Elektrolyte auf das Pflanzenplasma (I. Mitt.)	560
Flasch, Assunta: Die Festigkeit der Bindung einiger basischer Farbstoffe in vitalgefärbten Pflanzenzellen	593
Reiter, Liselotte: Zerfall homogener <i>Epiphyllum</i> -Eiweißspindeln in Fibrillen	615

Sammelreferate

Wochsmann, H.: Der Stand des Metachromasie-Problems	618
---------------------------------------------------------------	-----

Kurze Mitteilungen

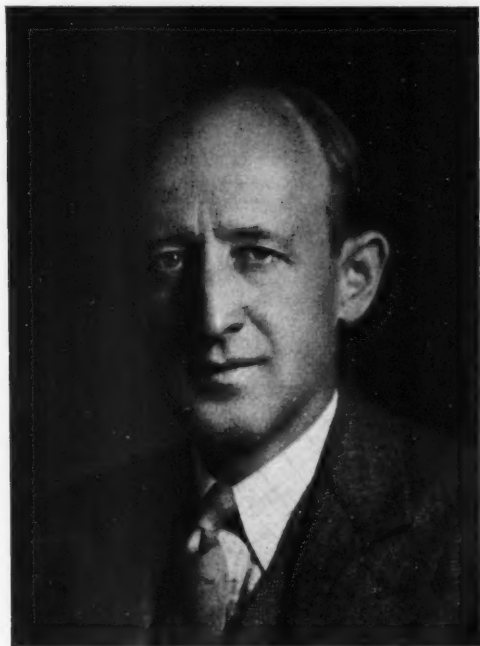
Höfler, K., W. Url und A. Diskus: Speicherkonkurrenz im Protoplasten einiger Meeresalgen bei Rhodamin-B-Färbung	630
Reiter, Liselotte: Eiweißwürfel in <i>Solanum demissum</i>	633

Referate

Referate	635
--------------------	-----

In memoriam William Seifriz

One of the great pioneers in the field of protoplasm research passed away suddenly to our great shock and deep sorrow. In the hot afternoon of July 13, 1955, there was a tall, distinguished-looking man collecting botanical specimens on the shore of Chesapeake Bay, 80 kilometers west of



Washington, D.C. He was Dr. William Seifriz, Professor of Botany at the University of Pennsylvania, who left a hotel near the bay shore telling the clerk that he intended to look for botanical specimens and would be back by the evening. But he never returned. The untimely death was said to have been instant due possibly to a stroke or heart attack. Thus ended all too abruptly the career of one of the rare individuals possessed of outstanding personality and most active scientific mind.

The "Protoplasma" has lost an irreplaceable collaborator who has been active as an associate editor since the foundation of the journal in 1926.

Born near the Capitol in Washington, D. C. on August 11, 1888, Professor Seifriz's early manhood was devoted to finding out what is worthwhile in the way of a life's work. His father, Paul Seifriz, M. D. (Berlin), arrived in U. S. A. from Germany in 1887 and developed medical practice in Washington. After his father's death, which occurred when Seifriz was still a child, his mother kept a boarding house for Department of Agriculture scientists. Here for nine years his early childhood was spent. This association with men of scientific interest ultimately led to his study of botany.

After finishing primary school in Washington, D. C. he entered McKinley Technical High School and graduated at the head of, and as valedictorian of his class in 1907. On his graduation from high school, he entered the U. S. Department of Agriculture as laboratory assistant and took charge of experimental electroculture.

After three years in the Department of Agriculture he went abroad and spent one year in his parents' motherland as practical student in a shipyard at Bremen. Returning to America he spent one year at law in Georgetown University at Washington. He then allowed an interruption to take place before he finally turned to science where he found true contentment. His study at Johns Hopkins University gave him the B. S. degree, *honoris causa*, and Ph. D. in botany in 1920.

After having finished the doctor's course at Johns Hopkins University he went to Europe in order to further his studies. Leaving Baltimore in June 1920 with his mother, he went through the Canadian Rockies to the West, crossed the Pacific, visited Japan, Java, Ceylon, India and reached Geneva in Switzerland in midwinter. In Geneva he worked on cell physiology in Professor Chodat's laboratory till June 1921. In the autumn of the same year, he went over to England where he continued his research in the Imperial College and King's College. This was followed by a stay in Berlin where he studied colloid chemistry at the Kaiser Wilhelm Institute under Professor Herbert Freundlich whose influence proved to be very great in his subsequent life both as a man and as a researcher. It was for the purpose of finding out tools with which to attack mechanisms underlying protoplasmic behaviour that he studied colloid chemistry.

The stay in different parts of Europe gave Professor Seifriz a great deal of familiarity with the old world and his travel through the southern parts of Asia on the way to Europe stimulated his interest in plant life in the tropics. In his later years he visited either Europe or tropical America again and again—Paris, Berlin, Vienna, Graz, Stockholm, Lund, Naples, Spain, Caucasus, Svanetia, Turkestan, Russian Lapland, Cuba, Jamaica, Martinique, Mexico, South America, Africa, etc. Foreign travels to him meant nothing very different from calling on next-door people.

After coming back to the United States in 1922 he was engaged with colloid chemical studies of protoplasm at Yale University as a Seessel

Fellow (1922–1923) and at the University of Michigan as an instructor before coming to the University of Pennsylvania in 1924 as a National Research Fellow. In 1925 he received his professorship at that university at which post he was active for thirty years as a protoplasmologist, a word which he coined, and also as a plant geographer. He may likewise be called a colloid chemist in as much as he conducted a series of experiments on the non-living colloid such as hydrocarbon emulsions or soap solutions.

One of Professor Seifriz's main objects in protoplasm research was finding out its submicroscopic structure. He directed his attention to the importance of studying its physical properties in order to look into the submicroscopic structure of protoplasm. And to investigate its physical properties he liked to resort to the delicate technique of microdissection which had hitherto not been in general use. In those early days when the now popular apparatus known as micromanipulator was not accessible, he used the Barber pipett holder, following Kite and Chambers, for microdissection and tried to estimate the physical properties such as viscosity and elasticity of protoplasm with a fine glass needle. He also took up avidly each new optical method available at the time, polarizing microscope, dark field condensor, Spierer lens, ultraviolet illumination, phase microscope up to electron microscope ever hoping to see further into the structure of living matter.

Professor Seifriz emphasized that protoplasm is non-Newtonian and generally elastic and insisted that these physical properties are accounted for by the existence of long chain molecules attached to each other in one way or other so that the structural continuity is formed. By way of illustrating the structure of living matter he likened it to a brush heap, which represented his basic concept in his theory of the submicroscopic structure of protoplasm. At a time when the idea of the structure of protoplasm was a confused mixture of fact and theory, Professor Seifriz took the lead to the modern view of the structure of living matter. Some of his early observations and interpretations were summarized in his stimulating book entitled "Protoplasm" (1936).

Among the physiological activities of protoplasm, he took special interest in the protoplasmic streaming. He analysed, by means of the time lapse motion picture, the protoplasmic motion of a slime mould, and gave the theory that the protoplasmic streaming in the plasmodium is caused by the rhythmic contractility of protein molecules. Cinematography was, together with microdissection, his most favourite means of research. His motion picture film with sound—titled "Seifriz on Protoplasm"—took prizes at several film festivals and was shown also on television.

His interest later was directed to correlating the physiology of excitation, anesthesia and toxicity with the colloidal state of protoplasm. In a word, we can say that throughout his studies on protoplasm, efforts are always paid to understand the structure and function of protoplasm in terms of colloid chemistry.

Ever since his student days at Johns Hopkins University, Professor

Seifriz had hankered for generous supplies of naked protoplasm. For that purpose, he hit upon *Physarum polycephalum*. The method for cultivating it in the laboratory was developed by Howard and later improved by Camp. From that time on for more than twenty years till he passed away his study of protoplasm was conducted mainly with this material. He was always willing to dish out samples of this slime mould to other investigators for researches of their own. Influenced by Professor Seifriz's example, *Physarum polycephalum* is now being widely used in many laboratories of the world, where much of the material either directly or indirectly came from his laboratory.

For the past several years, Professor Seifriz had been putting much effort to his *magnum opus* that was to be entitled "The Physiology of Protoplasm." In this work he was wholly rewriting and enlarging the contents of his previous book "Protoplasm" written twenty years ago. His death occurred when the manuscript was almost completed and his colleagues at the University of Pennsylvania are planning to assemble and publish it.

Professor Seifriz, who led an extraordinarily full and varied life, did not confine his scientific activities to the study of protoplasm. In order to study plant life, he travelled over all the continents except Australia from the tropical to the arctic zones. He also scaled Mt. Fuji in Japan, Mt. Gedeh in Java, Sierra Nevada de Santa Marta, a 5800 meter volcanic peak in Columbia, etc. There must be indeed few botanists who have observed plant life so widely throughout the world. Among the places where he went on his botanical trips, the West Indies and the southern provinces of Soviet Russia were particularly well studied. He wrote many reports on the plant life of West Indies, the representative one among them being "Plant Life in Cuba" (1943). His investigations in the southern provinces of Soviet Russia were published in the form of nine papers. His cherished desire was to have the results of his nearly forty years of study in plant geography all over the world culminate in a volume or volumes entitled "Plant Life of the World," for which he had been always making preparations. This work, if realized, would have played the role of a modern edition of Schimper's "Pflanzengeographie." No one at the present age would be better fitted than Professor Seifriz to be the author of such a book. It is a matter of deep regret for plant geography that he died before he completed it.

All in all, Professor Seifriz was not only a laboratory scientist, but also a naturalist who truly loved nature, plants and travel. There was furthermore something of the artist in him. The artist's enthusiasm and poet's imagination are also to be found in many aspects of his studies. This lent at times an apparently subjective colouring to his work on protoplasm. His experience in the tropics, such as the twining lianes in the jungle, and the endogenous rhythm governing the gregarious flowering, inspired him with keen interest in the spiral habit and the rhythmicity that were to be observed in nature and protoplasm. He was indeed fond of spirality and rhythm. "Spirality is King, and Rhythm Queen of the

Universe; and Structural Continuity, God of all." These were the words he once wrote me. In short, we can say that he was not a mere expert, but *ein großer Geist* with a broad original mind.

In his lecture to the students on the "Physics and chemistry of protoplasm" he gave, not merely dry facts, but also the background of the subject and "lines of thought by which the discoveries have come about." Students had ample opportunity to ask or to discuss whatever problems lay within the scope of the lecture. He also lectured on "Plants and climates" with many slides of beautiful photographs which he took in his botanical trips over the world.

Professor Seifriz's laboratory at the university stood apart from the main building of the Botany Department as an independent house which was rather old-fashioned and small-scaled according to the modern American standard. Nevertheless, he seemed to be satisfied with this laboratory. The door of his office was always left open when he was there. Not only students but also scholars both American and foreign, and many other kinds of people often came to visit him there. He was always frank, unassuming, and ready to meet them and to assist any one who came to him for advice or counsel on either scientific or private affairs.

At home Professor Seifriz was deeply devoted to his mother. He remained single for a long time even after her death, which had been a great loss to him. He was married for the first time three years ago, at the age of 64, to Myra George by whom he is survived.

The house where Professor Seifriz lived before World War II was on the hill at Chester Springs, 50 kilometers from Philadelphia—an attractive idyllic dwelling that stood by itself. He lived there a quiet bachelor's life, collected old Italian bronze and French porcelain, permitted no telephone in his home. His love of birds and animals led him to keep a host of birds, a pair of monkeys and of Mexican donkeys besides a dog, cats, rabbits, peacocks, etc. This place, which was known as *Seifriziana* among his friends, used to be the site of the "Philosophical Meetings" that were held periodically in spring and autumn. At those meetings, of which Professor Seifriz was the chairman, were invited artists, musicians, scientists, medical doctors, psychologists and all other types of intellectuals who held lively discussions, had tea and supper together and enjoyed the friendly atmosphere.

Professor Seifriz excelled as a lecturer as well as a chairman of many kinds of meetings. He spoke with a great charm of personality and sense of humour. He admired ability and integrity in others. Joyous and liberal by nature, he loved life and lived every minute of it.

Professor Seifriz was elected as a member of numerous scientific societies including Sigma Xi and Phi Beta Kappa—both national honour societies—and was active as associate editor of "Journal of Colloid Science" and "Biodynamica" besides "Protoplasma."

His generosity, his enthusiasm and his breadth of interests testify to his stature even more than any single contribution to learning. Those who had the good fortune to work in his laboratory or to know him closely,

will remember him as one of the most inspiring teachers and gracious companions that one could desire. Science has lost one of its great figures in protoplasm research.

Noburô Kamiya, Osaka.

List of Publications of the Late Professor William Seifriz

1918

- [1] Observations on the structure of protoplasm by aid of microdissection. Biol. Bull. Am. 34, 307—324.

1920

- [2] Viscosity values of protoplasm as determined by microdissection. Bot. Gaz. 70, 360—386.
[3] The length of the life cycle of a climbing bamboo. A striking case of sexual periodicity in *Chusquea abietifolia* Grieseb. Amer. J. Bot. 7, 83—94.
[4] New England falls. Johns Hopkins Alum. Mag. 8, 347—350.

1921

- [5] Observations of some physical properties of protoplasm by aid of microdissection. Ann. Bot. 35, 269—296.

1922

- [6] A method for inducing protoplasmic streaming. New Phytologist 21, 107—112.

1923

- [7] Observations on the reaction of protoplasm to some reagents. Ann. Bot. 37, 489—509.
[8] Phase reversal in protoplasm and emulsions. Science 57, 694—696.
[9] Phase reversal in emulsions and protoplasm. Amer. J. Physiol. 66, 124—139.
[10] Reaction of protoplasm to salts and antagonistic action of salts and alcohol. Bot. Gaz. 76, 389—402.
[11] The altitudinal distribution of plants on Mt. Gedeh, Java. Bull. Torrey Bot. Club 50, 283—306.
[12] The gregarious flowering of the orchid, *Dendrobium crumenatum*. Amer. J. Bot. 10, 32—37.
[13] Observations on the causes of gregarious flowering in plants. Amer. J. Bot. 10, 93—112.
[14] Things academic in Europe. Johns Hopkins Alum. Mag. 12.
[15] Über die Elastizität von Solen und Gelen. Z. physikal. Chem. 104, 233—264 (with H. Freundlich).

1924

- [16] The structure of protoplasm and inorganic gels: an analogy. Brit. J. exper. Biol. 1, 431—443.
[17] An elastic value of protoplasm, with further observation on the viscosity of protoplasm. Brit. J. exper. Biol. 2, 1—11.

- [18] The gregarious flowering of the talipot palm, *Corypha umbraculifera*, at Peradeniya, Ceylon. Bull. Torrey Bot. Club 51, 341—350.
- [19] The altitudinal distribution of lichens and mosses on Mt. Gedeh, Java. J. Ecology 12, 307—313.

1925

- [20] Elasticity and some structural features of soap solutions. Colloid Symposium Monograph 3, 285—295.
- [21] Studies in emulsions. I. Types of hydrocarbon oil emulsions. J. Physical. Chem. 29, 587—595.
- [22] Studies in emulsions. II. The effect of electrolytes on petroleum oil emulsions. J. Physical. Chem. 29, 595—600.
- [23] Studies in emulsions. III. Double reversal of oil emulsions occasioned by the same electrolyte. J. Physical. Chem. 29, 738—744.
- [24] Studies in emulsions. IV. Multiple systems. J. Physical. Chem. 29, 744—746.
- [25] Studies in emulsions. V. The stabilization membrane. J. Physical. Chem. 29, 746—749.
- [26] Studies in emulsions. VI. The effect of acidity on type and reversibility of emulsions. J. Physical. Chem. 29, 834—837.
- [27] Studies in emulsions. VII. The effect of phase ratio and of method in handling on emulsion type. J. Physical. Chem. 29, 837—840.
- [28] Studies in emulsions. VIII. A comparison of the behavior of vegetable oils with that of petroleum oils. J. Physical. Chem. 29, 840—841.

1926

- [29] Protoplasmic papillae of *Echinarrhynchus* oocytes. Protoplasma 1, 1—14.
- [30] The physical properties of erythrocytes. Protoplasma 1, 345—365.
- [31] Elasticity as an indicator of protoplasmic structure. Amer. Naturalist 60, 124—132.
- [32] Protoplasmic structure. Internat. Congr. Plant Sci., Sect. Cytol. Ithaca, N.Y. 251—258.

1928

- [33] New material for microdissection. Protoplasma 3, 191—196.
- [34] Die physikalischen Eigenschaften des Protoplasmas. Arch. exper. Zellforsch. 6, 341—348.
- [35] Physical properties of protoplasm. In "Colloid Chemistry" ed. by J. Alexander 2, 403—450.
- [36] How do the life process work? Scientific American 138, 17—22.
- [37] Book review of "Biol. Chem. Lab. Method for Students of Biol. Sciences" by Clarence Austin Morrow. Science 67, 533—535.
- [38] Science in Russia today. Scientific Monthly 26, 433—438.
- [39] Europe of today. Gen. Mag. and Hist. Chron. 30, 136—145.

1929

- [40] The viscosity of protoplasm: molecular physics in relation to biology. Bull. Nat. Res. Council 69, 229—261.
- [41] The contractility of protoplasm. Amer. Naturalist 63, 410—434.
- [42] The structure of protoplasm. Biol. Rev. 4, 76—102.

1930

- [43] The plasticity of protoplasm. *J. Rheology* 1, 261—268.
- [44] The alveolar structure of protoplasm. *Protoplasma* 9, 177—208.
- [45] Book review of "Outlines of Biochemistry" by Ross Aiken Gortner. *Science* 71, 189—191.

1931

- [46] Effects of salts on the extensibility of protoplasm. *J. Rheology* 2, 263—270.
- [47] The Spierer lens and what it reveals in cellulose and protoplasm. *J. Physical. Chem.* 35, 118—129.
- [48] The structure of protoplasm. *Science* 73, 648—649.
- [49] Radiant energy from living matter. *Science Education* 16, 34—37.
- [50] Sketches of vegetation of some southern provinces of Soviet Russia. Introduction. I. The altitudinal distribution of plants on the Crimean Mountain. *J. Ecol.* 19, 361—371.
- [51] Sketches of vegetation of some southern provinces of Soviet Russia. II. Plant life along the Georgian military way, North Causasus. *J. Ecol.* 19, 372—382.

1932

- [52] Sketches of vegetation of some southern provinces of Soviet Russia. III. Plant life in the Bakuriani Bases, Minor Caucasus. *J. Ecol.* 20, 53—68.
- [53] Sketches of vegetation of some southern provinces of Soviet Russia. IV. Autumnal plants at Repetek Turkmenistan. *J. Ecol.* 20, 70—77.
- [54] Sketches of vegetation of some southern provinces of Soviet Russia. V. The plant life of the Transilian Mountain range in Semerechje, eastern Turkestan. *J. Ecol.* 20, 78—89.

1933

- [55] Twisted trees and spiral habit. *Science* 77, 50—51.
- [56] More about the spiral habit. *Science* 78, 361—363.
- [57] The Gurwirth rays. In "Science of Radiology" (Chap. 25), 412—427.

1934

- [58] Propriétés physiques du protoplasma de Myxomycètes. *Rev. gén. Bot.* 46, 3—10.
- [59] The origin, composition and structure of cellulose in the living plant. *Protoplasma* 21, 129—159.
- [60] The Sierra Nevada de Santa Marta: an ascent from the north. *Geogr. Rev.* 24, 478—485.
- [61] The plant life of Russian Lapland. *Ecology* 15, 306—318.

1935

- [62] The effects of acids and alkalies on the viscous and structural properties of protoplasm. *Physics* 6, 159—161.
- [63] The structure of protoplasm. *Bot. Rev.* 1, 18—36.
- [64] Sketches of vegetation of some southern provinces of Soviet Russia. VI. The flora of the south-eastern slopes of the Mt. Elbrus and the upper Baksan Valley, Caucasus. *J. Ecol.* 23, 138—146.

- [65] Sketches of vegetation of some southern provinces of Soviet Russia. VII. The plant life of Svanetia, Trans-Caucasus. *J. Ecol.* 23, 147—160.
- [66] A slime mould pigment as indicator of acidity. *Protoplasma* 23, 175—179 (with M. Zetzmann).

1936

- [67] * *Protoplasm*. New York.
- [68] Reaction of protoplasm to radium radiation. *Protoplasma* 25, 196—200.
- [69] The structure of protoplasm. *Bull. Soc. Biol. Lettonie* (1936), 87—99.
- [70] Spierer lens and colloidal structure. *Ind. Eng. Chem.* 28, 136—140.
- [71] Breakdown of fruit and vegetable tissue due to an electric current. *Plant Physiol.* 11, 195—200.
- [72] Vegetation zones in the Caucasus. *Geogr. Rev.* 26, 59—66.
- [73] The structure of paper pulp fibers. *Paper Trade J.* (May 1936), 2 pp. (with C. W. Hock).
- [74] The fruiting of Myxomycetes. *New Phytol.* 35, 472—478 (with M. A. Russell).

1937

- [75] A theory of protoplasmic streaming. *Science* 86, 397—398.
- [76] Methods of research on the physical properties of protoplasm. *Plant Physiol.* 12, 99—116.
- [77] Die Höhenstufen der Vegetation in der Sierra Nevada von Santa Marta. *Bot. Jb.* 68, 107—141.

1938

- [78] * *Physiology of plants*. New York.
- [79] The structure of living matter. *Biodynamica* 2 (No. 32), 1—7.
- [80] That word "emulsoid." *Science* 87, 212—214.
- [81] Recent contributions to the theory of protoplasmic structure. *Science* 88, 21—25.
- [82] The centenary of the cell theory. *Chronica Botanica* 4, 485—487.

1939

- [83] The symmetrical distribution of protoplasmic particles in an electric field. *Protoplasma* 32, 536—537.
- [84] Pathological changes in protoplasm. *Protoplasma* 32, 538—550.
- [85] A materialistic interpretation of life. *Philosophy of Science* 6, 266—284.

1940

- [86] Vegetational zones: a problem in terminology. *Geogr. Rev.* 30, 501—502.
- [87] Die Pflanzengeographie von Cuba. *Bot. Jb.* 70, 441—462.
- [88] Microdissection of paper pulp fibers. *Paper Trade J.* (Feb. 1940), 2 pp.
- [89] Theoretical and experimental studies on protoplasmic streaming. *Science* 92, 416 (with N. Kamiya).

1941

- [90] A theory of anesthesia based on protoplasmic behavior. *Anesthesiology* 2, 300—309.
- [91] A symposium on the structure of protoplasm. *Chronica Botanica* 6, 241—245.

* Published in book form.

- [92] Reproductive cycles in plants. *The Caribbean Forester* 3, 11—24.
- [93] Our science meeting again. *Science* 93, 184.
- [94] Foreword. In "The Cytoplasm of the Plant Cell" by A. Guilliermond (1941), 3 pp.
- [95] Shock anesthesia in Myxomycetes. *Biodynamica* 3 (No. 67), 191—197 (with N. Epstein).
- [96] The toxic effects of heavy metals on protoplasm. *Amer. J. Bot.* 28, 191—197 (with M. Uraguchi).

1942

- [97] Introduction. In "Structure of Protoplasm," ed. by W. Seifriz, Ames, Iowa, 1—9.
- [98] Some physical properties of protoplasm and their bearing on structure. In "Structure of Protoplasm," ed. by W. Seifriz, Ames, Iowa, 245—264.
- [99] Textbooks on colloidal chemistry. *Science* 96, 339—340.
- [100] In memoriam Dr. Laurence S. Moyer. *Science* 96, 103—104.

1943

- [101] Protoplasmic streaming. *Bot. Rev.* 9, 49—123.
- [102] Creative imagination and indeterminism. *Philosophy of Science* 10, 25—33.
- [103] The plant life of Cuba. *Ecol. Monogr.* 13, 375—426.
- [104] The plant life of the Caucasus. *Morris Arboretum Bull.* 4, 31—36.

1944

- [105] Exotoxin from slime molds. *Science* 100, 74—75.
- [106] The ebb and flow of life. *Gen. Mag. and Hist. Chron.* 46, 235—240.
- [107] The anesthesia of excised chick hearts and its relation to the myogenic and neurogenic origin of the heart beat. *Anesthesiology* 5, 589—596 (with M. Ross).
- [108] Physical activities and respiration in slime molds. *Growth* 8, 221—233 (with F. Urbach).
- [109] Protoplasm. *Medical Physics* 1, 1127—1145.

1945

- [110] The structure of protoplasm. II. *Bot. Rev.* 11, 231—259.
- [111] The physical properties of protoplasm. *Ann. Rev. Physiol.* 7, 35—60.
- [112] Anaerobic respiration. *Science* 101, 88—89.
- [113] The coagulation of latex. *Science* 102, 378—380.
- [114] Surface composition of latex particles electrophoretically determined. *India Rubber World* (1945), 587—588, 729—730.
- [115] Book review of "Colloid Chemistry, vol. V, Theory and Methods, Biology and Medicine," coll. and ed. by J. Alexander. *Arch. Biochem.* 6, 365—369.

1946

- [116] Torsion in protoplasm. *J. Colloid Sci.* 1, 27—32.

1947

- [117] The properties of protoplasm with special reference to the influence of enzymatic reactions. *Adv. Enzymol.* 7, 35—64.

1948

- [118] Pathogenecity and isosterism. *Science* 107, 15—16.

1949

- [119] Toxicity and the chemical properties of ions. *Science* 110, 193—196.
[120] Book review of "Submicroscopic Morphology of Protoplasm and its Derivatives" by A. Frey-Wyssling. *J. Colloid Sci.* 4, 441—444.
[121] A colloidal interpretation of biological stimulation and depression. *J. Colloid Sci.* 4, 19—24 (with H. Pollack).
[122] Eine Theorie über den Mechanismus der Erregung. *Protoplasma* 39, 53—61 (with H. L. Pollack).
[123] Toxicité et structure moléculaire des xanthines et des barbiturates. *Arch. des Sciences* 2, 9—21 (with H. L. Pollack).

1950

- [124] The effect of various anesthetic agents on protoplasm. *Anesthesiology* 11, 24—32.
[125] Les transformations sol-gel du protoplasme. *Rev. Hématol.* 5, 591—602.
[126] Protoplasm, supplement to vol. I, 1127—1145. *Medical Physics* 2, 744—747.
[127] The gregarious flowering of *Chusquea*. *Nature* 165, 635—636.

1951

- [128] Molecular interpretation of toxicity. *Protoplasma* 40, 313—323.
[129] The microchemistry of toxicity. *Mikrochemie vereinigt mit Mikrochimica Acta* 36 u. 37, 1114—1127.

1952

- [130] Rheological properties of protoplasm. In "Deformation and Flow in Biological System," ed. by A. Frey-Wyssling, New York, 3—156.

1953

- [131] Mechanism of protoplasmic movement. *Nature* 171, 1136—1138.
[132] Le mécanisme des mouvements protoplasmiques. *Rev. Cyt. Biol. végét.* 14, 31—37.
[133] In memoriam Walter T. Swingle. *Science* 118, 288—289.
[134] The ecology of thicket formation. *Vegetatio Acta Geobotanica* 4, 155—168.

1954

- [135] A new university. *Science* 120, 87—91.
[136] Torsion in a protoplasmic thread. *Exper. Cell Res.* 6, 1—16 (with N. Kamiya).

1955

- [137] Poetic imagination necessary in rigid, scientific pursuit of truth. *Daily Pennsylvanian* (Jan. 14), 7.
[138] Microscopic and submicroscopic structure of cytoplasm. *Handb. d. Pflanzenphysiol.* (ed. by W. Ruhland) 1, 301—339.
[139] The physical chemistry of cytoplasm. *Handb. d. Pflanzenphysiol.* (ed. by W. Ruhland) 1, 340—382.
[140] Pathology. *Handb. d. Pflanzenphysiol.* (ed. by W. Ruhland) 1, 383—400.

Papers with the year of publication uncertain

- [141] An intelligent understanding of man. In "Perspectives on a Troubled Decade" 55—71.
[142] The golden mean. In "Perspectives on a Troubled Decade" 531—544.

Works to be published

- [143] Kinetics of cellular processes. Handb. d. Pflanzenphysiol. (ed. by W. Ruhland) 2.
[144] *The physiology of protoplasm.

Acknowledgments

I should like to express my sincere thanks to Mrs. William Seifriz and Miss Helen Ligget, who helped me by sending Professor Seifriz's biographical data and also by filling gaps of the list of his publications.

Structural and Chemical Properties of the Contractile Vacuole of *Amoeba proteus*¹

By

A. Bairati and F. E. Lehmann

Institute of Anatomy, University of Milan, Italy, and Theodor Kocher Institute
Berne, Switzerland. Zoological Institute, University of Berne, Switzerland

With 8 Figures

(Received July 8, 1955)

I. Introduction	525
II. Methods and Material	526
III. Experimental Results	526
1. Phase contrast and dark field	526
2. Polarized light	527
3. Histochemical Results	529
4. Submicroscopic structure of the 3 layers	529
a) Inner layer. b) External layer. c) Intermediate or fibrous layer.	
IV. General considerations	533
1. Function and submicroscopic structure of contractile vacuole wall	533
2. The importance of stabilizing cytoplasmic structures before fixation and the role of different fixing agents	535
V. Summary	536
VI. Bibliography	538

I. Introduction

Contractile vacuoles (c.v.) are small vesicles containing water found in the cytoplasm of certain cells. They increase in volume, discharge, reappear, grow, discharge again and so on. They occur in many Protozoa, including almost all fresh water forms. Under normal conditions the contractile vacuole of *Amoeba proteus* attains a diameter of 50 μ or more and the growth phase or diastole lasts about 5 min. Discharge or systole is almost always rapid, rarely exceeding about a second in duration (Kitching 1952, p. 145). The phenomena of systole cannot, as

¹ Carried out with the aid of the Federal Commission for Advancement of Scientific Research from the Fund for Promoting Employment.

Kitching points out, be explained at present. It is not possible to decide whether the c.v. wall contracts actively or not. Some preliminary observations on the submicroscopic structure of the wall of the c.v. (Bairati and Lehmann 1951) had shown some fibrillar structures, which might serve as actively contracting mechanism. Therefore we decided to investigate with several different methods the properties of the wall of the c.v. The methods applied to the c.v. were similar to those used for the plasmalemma of *Amoeba* (Bairati and Lehmann 1953). We refer, as far as some technical details are concerned to this earlier paper.

II. Methods and Material

The c.v. was observed either in the normal animal or in centrifuged amoebae. After centrifugation the c.v. was situated in the centripetal region, sometimes in the neighbourhood of a few liquid containing vacuoles. The c.v. was easily distinguished from other vacuoles by the adhering layer of mitochondria (Fig. 1).

The preparations of the c.v. were always taken from centrifuged and subsequently fixed amoebae. The centripetal region, containing the vacuole was cut off by a fine glass needle and then fragmented. The suspension of fragments contained besides large pieces of the vacuole wall also regularly fragments of the plasmalemma.

The fixing fluids used were: Osmium Tetroxyde: 2%; Formaline: 10% (pH 7.2); Acetone: 100%; Acetone-Alcohol: 1:1. Bensley: Potassium Bic. (5%) 7 ml., Os-T. (2%) 3 ml. Carnoy: Alcohol abs. 60 ml., Chloroform 30 ml., Acetic acid 10 ml. Bouin: Picr. acid sat. 15 ml., Formaline conc. 5 ml., Acetic acid 1 ml. Maximow: Zenker 6 ml., Os-T. (2%) 4 ml. Rabl: Sublimate sat. 5 ml., Picr. acid sat. 5 ml. Regaud: Kalium Bicr. (3%) 8 ml., Formaline conc. 2 ml. Serra: Alcohol abs. 6 ml., Formaline conc. 3 ml., Acetic acid 1 ml. Zenker: Kalium Bicr. 2.5 gr., Na_2SO_4 1 gr., Sublimate 5 gr., dist. Water 100 ml., Acetic acid 5 ml.

III. Experimental results

1. Phase contrast and dark field

The observations with phase contrast and dark field microscopy did not give results which differed much from the ones made with the ordinary light microscope. Especially the examination in the dark field is not very successful in this case because of the strong light diffraction of the vacuole which does not permit to distinguish minute structures. The phase contrast microscope shows very clearly two layers in the vacuole wall (Fig. 1). The inner layer, which bounds the vacuole cavity appears as homogenous and very thin, as in other vacuoles. The outer layer is thicker and resembles the gelified hyaloplasm. It contains the mitochondria, which are distributed rather regularly. The thickness of the outer layer changes with the c.v. volume. During maximal diastole it is very thin.

Microscopical observation of the fixation process shows, that the c.v. is preserved by all kinds of fixing fluids. Mixtures containing acetic acid produce a sensible volume reduction, which is even greater after action of dehydrating fluids.

Whereas the optical properties of the internal layer are not essentially changed

by fixation, the external layer does show some modifications after treatment with certain fixing fluids. There is no change after formaline treatment. Fixing fluids, containing osmium tetroxyde, slowly produce a brownish colour. This fact has been taken as an indication that the outer layer corresponds to the Golgi Zone (Brown), which however has been contested by Singh (1938). Fixing fluids containing acetic acid, alcohol or acetone bring about a considerable turbidity. The mitochondria disappear. Fixing fluids containing picric acid alter the form of mitochondria without destroying them entirely.

2. Polarized light

Examination of the c.v. wall with polarized light reveals structural properties, which are not demonstrable in other vacuole walls. The factors which are responsible for the birefringence of the vacuole wall can be influenced experimentally. From this it is possible to derive some conclusions concerning the constituents of the vacuole wall.

In the vacuole wall of the living amoeba, there exists a weak birefringence. It is, in accordance with the statements of W. J. Schmidt, positive in relation to the tangent of the wall surface. Repeated measurements with the compensators of Brace and Eyringhaus gave retardation values of 40 to 50 Å. These values are not influenced by the thickness of the c.v. wall. These facts might be interpreted by the assumption of filamentous proteins, arranged in the tangent of the vacuole wall. But the results of our various experiments on the characteristics of birefringence indicate that the situation might be more complex.

The birefringence of the c.v. wall during fixation is influenced as follows. Formaline has no effect. All precipitating and dehydrating agents which produce turbidity also increase the retardation values. Also osmium tetroxyde, which does not influence the turbidity, increases the retardation values. In order to understand these facts better, we have made some additional experiments.

a) *Textural birefringence.* Various fixed amoebae were imbibed with a series of liquids, the refraction values of which increase progressively from the distilled water to the one of methylene iodide (1.74). It can be concluded from our data, that the total birefringence of the c.v. of fixed amoebae includes a component of textural birefringence, which is positive in relation to the tangent. There is another component of intrinsic birefringence which is positive in the same sense. It can be seen from

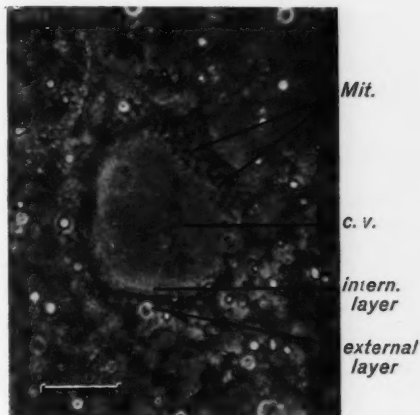


Fig. 1. Photomicrograph (Phase contrast) of a contractile vacuole fixed with neutral formaline. Groups of Mitochondria are visible. $20 \mu = 15 \text{ mm}$.

the curves of Fig. 2, that birefringence decreases with the increase of refraction index of the liquids used up to the values of 1.51–1.57 where it reaches a minimum. This is very near to the values found in the living amoeba. From the minimum values there is again an increase of retardation with increasing refractive index of the liquids used.

b) *Intrinsic birefringence* is neither changed by hyaluronidase nor by phenolic treatment. It disappears during tryptic digestion, which destroys the structure of the c. v.

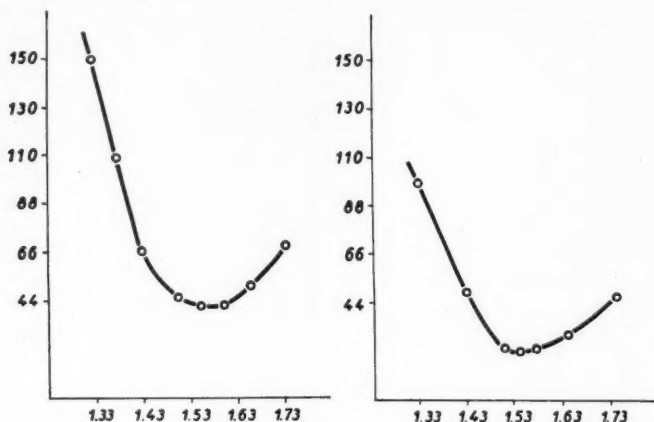


Fig. 2. Curves of retardation values of the c.v. wall measured with the compensator of Brace after successive imbibition with liquids of different refraction index. On the abscissa are marked the values of refraction, on the ordinate the retardation values (see also Bairati and Lehmann 1953). — Fig. A. After fixation with Bouin's liquid. Fig. B. After fixation with osmium tetroxide.

c) *Osmic treatment* after fixation with Lipoid-solvents does not alter the birefringence.

These facts can be explained by the assumption, that the fixing fluids, which produce turbidity (increase of the refraction index of the c. v. structures) induce the formation of a composite body with textural birefringence, as we have shown in the case of the plasmalemma. This birefringence appears in addition to the intrinsic birefringence already present and increases the total value of retardation.

The effects of OsO_4 might be interpreted on the base of two different assumptions. 1. OsO_4 disturbs the orientation of lipids, which normally give a negative birefringence in relation to the tangent. This might contribute to the increase of the positive birefringence by abolishing the birefringence of the lipids. (There are however several facts not in favor of this assumption.) 2. Although OsO_4 does not produce an increase of turbidity, it may act in a similar manner as the other fixing fluids: it produces a composite body in the hyaloplasmic layer by precipitating the hydrated hyaloplasmic reticulum and does not form coarse aggregates.

Whereas the textural birefringence seems to prevail in the external or hyaloplasmic layer, the intrinsic birefringence must be mainly localized in the molecular organization of the internal layer (fibrillar proteins) not visible in the ordinary light microscope.

3. Histochemical results

The c. v. is rapidly digested either by trypsin at pH 7.5 or by pepsine at a pH 2.5. 0.1% solutions of hyaluronidase have no influence upon the c. v.

The internal layer of the c. v. is weakly metachromatic after staining by toluidine blue and gives furthermore a clear Hotchkiss reaction after acetone fixation. The external layer is osmophilic. In squashed amoebae, the c. v. persists for a short time as a thin walled vesicle. The internal layer disintegrates finally. During this phase it forms filamentous and globular structures like the disintegrating plasmalemma.

From all this data one arrives at the assumption, that the internal layer of the c. v. contains mucoprotein material similar to the one of the plasmalemma.

4. Submicroscopic structure of the 3 layers of the contractile vacuole

Our electron-microscopical investigations showed mainly, that c. v. wall contains not only two but *three layers*. Between the outer and inner layer, an intermediate layer exists which shows a characteristic fibrous structure and many microsome-like globular bodies. It is not surprising, that this layer could not be detected by optical methods, because it is too subtle and too intimately connected with the outer hyaloplasmic layer. Also in electron microscopical preparations it is rather difficult to obtain clear pictures of the intermediate layer, because the wall of the c. v. as a whole is not sufficiently permeable to the electron beam. Therefore it was necessary to crush at least partially the external layer in order to obtain fragments in which the intermediate layer was adhering to the inner layer (Fig. 3). After treatment with some fixing

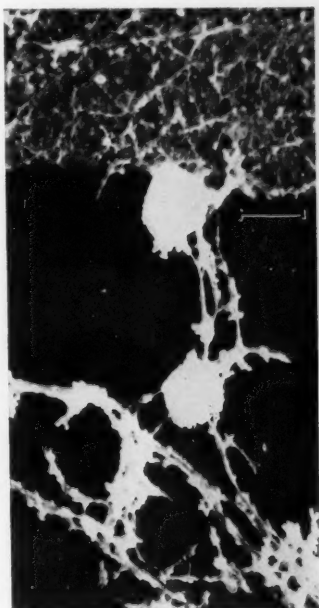


Fig. 3. Large fragment of the c. v. wall (Electron micrograph). In the lower part of the figure a detached piece of the outer layer containing reticular fibers with adhering microsomes and two large mitochondria. In the upper part a fragment of the intermediate layer with densely packed fibers. (Bouin's fixative.)
— $1\mu = 12\text{ mm}$.

fluids it was in fact possible to obtain somewhat larger fragments. These fragments showed a rather different structure in different cases. We ascribe these variations to the respective state of systole or diastole of the vacuole wall.

A systematic and thorough examination of many pictures obtained from specimens fixed by different fluids leads to the following conclusions concerning the structure of the three layers of the vacuole wall.

a) *The internal layer* is very subtle (Fig. 4). Its structure varies somewhat with the changes of volume of the vacuole. It is not destroyed by any of the fixing fluids applied and its appearance is almost invariably the same. Its structure is very similar to the one of the plasmalemma, as described in an earlier paper (Bairati and Lehmann 1953). The internal surface appears rather smooth and composed of densely packed globular bodies of an average diameter of 200 Å. The outer surface attached to the intermediate seems to show a similar structure, but it is difficult to photograph because of the adhering fragments of the other layers attached to it.

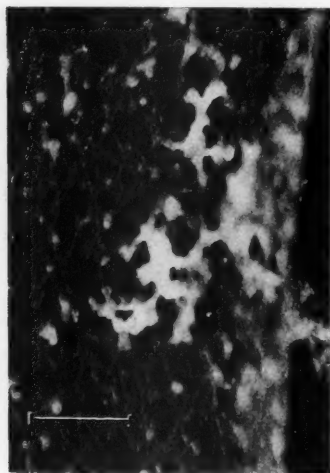


Fig. 4. Fragment of a very thin part of the fibrous layer with a network of delicate fibers attached to the internal mucous layer. The lateral part of fragment is folded so that the smooth surface of the internal layer is shown. (Bouin's fixative.) $1 \mu = 21 \text{ mm}$.

b) *The external layer* shows very similar structures as ordinary hyaloplasm fixed in gelated state (Fig. 3). Recently we have discussed these structures in a communication (Bairati and Lehmann 1954) dealing especially with the fixation of microsomes. It is not easy to compare the state of fixed hyaloplasmic structures with the living one. Probably the hyaloplasmic layer of the c. v. is in the living animal a very hydrated reticulum with microsomes suspended in it. Fixation might con-

dense filamentous structures to an irregular network, which contains the dehydrated reticulum and the adhering microsomes. In the following, some facts are mentioned which might help to understand the polarized light observations.

1. The hyaloplasmic layer possesses after fixation a considerable thickness, which inhibits almost entirely the permeation of electrons. At least a partial fragmentation is necessary in order to obtain photographs of the fine structure.

2. After fixation by osmium tetroxyde the external layer is particularly compact and impermeable to electrons. After sufficient fragmentation it shows a cotton-like structure which is quite typical for osmic treatment

(Bairati and Lehmann 1954). There are no microsomes visible, only the mitochondria are present.

3. All other fixing fluids preserve the external layer as a reticulum described above (Fig. 3). This condensed reticulum contains always after pretreatment by versene and fixation with fluids containing acetic acid numerous very dense microsome-like bodies. The mitochondria are only preserved after versene pretreatment, if acetic fixing fluids are used.

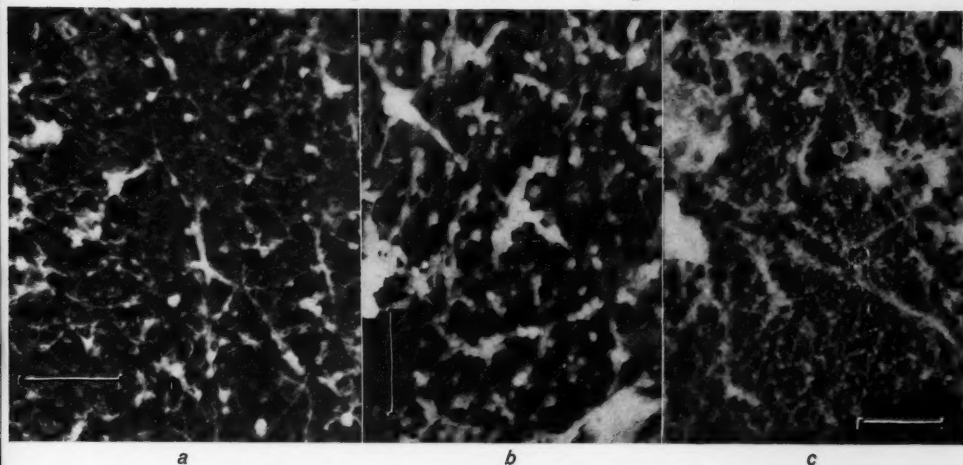


Fig. 5. Different fragments of fibrous layer. (Electron micrographs.) a) Felt-like dense fibrous structure with few microsomes (Bouin's fixative after pretreatment with Versene). $1\mu = 18\text{ mm}$. b) Dense and coarse fibers with numerous microsomes (fixative the same as in 5a). $1\mu = 20\text{ mm}$. c) Only coarser fibers recognizable, microsomes and smaller fibers partially disintegrated (Zenker's fixative after pretreatment with Versene). $1\mu = 16\text{ mm}$.

4. The external layer fixed as reticulum can be considered as a more or less porous structure and might therefore possess textural birefringence which is observed in the fixed vacuole wall.

c) *The intermediate or fibrous layer.* The constituents of this layer are: a network of fibers which are more or less individualized, microsome-like bodies and larger particles of a diameter of about one third of the mitochondria. The structure of the layer varies considerably under different conditions. (See Addendum on p. 539.)

1. Picric acid fixing fluids appear to be very well suited, because they induce considerable retraction of the hyaloplasmic from the intermediate layer. The best results have been obtained after versene pretreatment and with fixing agents containing acetic acid. (See Fig. 3, 5a and 5b, 6.)

2. Fixing fluids containing heavy metals or alcohol, but without acetic acid do not preserve satisfactorily this fibrous layer. The fibers are rather indistinct and the microsomes are not very clear

(Fig. 7 a). On the contrary, the structures are well preserved by fixing fluids containing acetic acid, especially if the amoebae had been pretreated

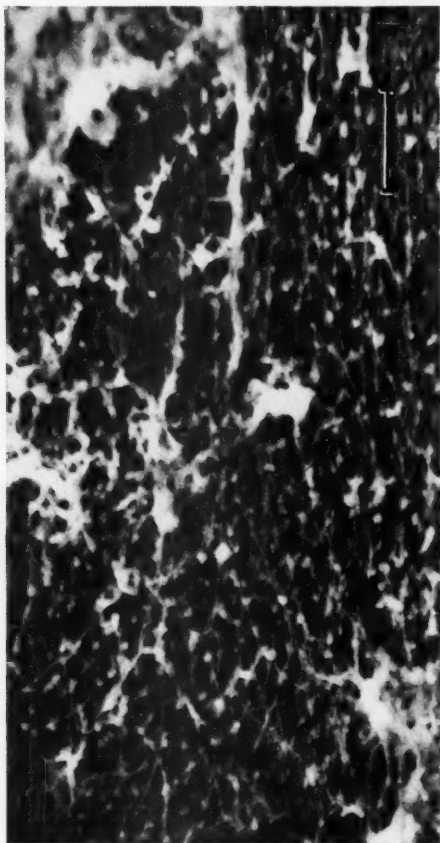


Fig. 6. Large fragment of intermediate layer, showing regular texture of fibrous network. Numerous microsomes attached to fibers. (Fixation the same as in Fig. 5 a.) $1\mu = 20\text{ mm}$.

of large fragments of the c. v. reveals in the density and structure of fibers. Even in the same vacuole

by versene (Fig. 5 c). The structures obtained in this way by Carnoy fixation are very similar to those observed after picric fixations (Bairati and Lehmann 1954). The large bodies are also preserved even by lipid solvent fixing fluids like alcohol (Fig. 7 a).

3. Osmic fixing fluids bring about a fusion of the fibrous and hyaloplasmic layers. Only the long fibers remain distinguishable. Microsomes and fine fibers cannot be found. Also osmic treatment preserved the large bodies (Fig. 7 b and 7 c).

4. Structural properties of the intermediate layer. The fibrous structures present in the intermediate layer do not always show very clear boundaries, probably because some other material is precipitated on them. Many fibers show a structure like a chain of globules. In numerous electron micrographs, some very distinct fibers are present with a distinct periodic structure². Furthermore as already stated, the structure of the fibrous layer is not the same over the whole wall of the c. v. The structure considers considerable local differences

² While this manuscript was in print, we have made several new electron-micrographs of some much extended vacuole walls. The subtle fibers appear as regular chains of globules of an order of magnitude of about 150 \AA . The whole period has about a value of 210 \AA . These globules are also regularly distributed within the disc-like spots which unite the fibers. The periodic structure was found after various fixations always combined with versene pretreatment.

after the same fixation different structures are to be found: a) Long, well individualized filamentous meshes of different width with few microsomes (Fig. 5 a). b) Dense platelike bodies, from which short fibers radiate and connect different bodies. c) There are larger fibers with rather few anastomosis and numerous microsomes. d) A reticulum with narrow meshes and many microsomes (Fig. 5 b). e) Filaments of different length which are fixed to the outer surface of the internal layer. f) The large bodies are not distributed uniformly.

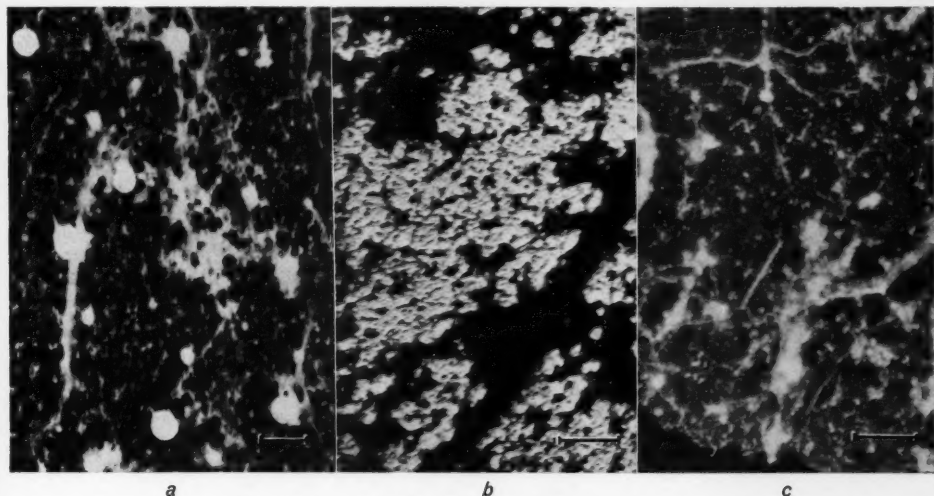


Fig. 7. Intermediate layer, after fixation with solutions which apparently do not preserve sufficiently the fibrous layer of the c.v. a) Coarse fibers present, also some globules of unknown nature. Microsomes and finer fibers are lacking (fixative: Acetone-Alcohol). $1\mu = 9\text{ mm}$. b) Few remainders of network present. Structure regularly found in all OsO_4 fixed fragments. (Fixative: OsO_4). $1\mu = 12\text{ mm}$. c) Fibrous network not entirely disintegrated. Mucous appearance of the whole material. (Fixative: Maximow's fluid.) $1\mu = 12\text{ mm}$.

The fine structure of the fibrous layers is most clearly demonstrated in c.v. of amoebae, which had been starving during two days. In this case very transparent layers are obtained showing a very distinct fibrous structure with many microsomes (Fig. 6). These local differences might be correlated with local functional differences of the vacuole wall.

IV. General considerations

1. Function and submicroscopic structure of contractile vacuole wall

Our observations lead to some conclusions concerning the functional structure of the vacuole wall (Fig. 8). The internal layer which limits the vacuole cavity contains probably a high percentage of mucoproteins as

the plasmalemma. Like in the plasmalemma the rapid autolysis of internal layer observed by us indicates presence of strong enzymatic systems,

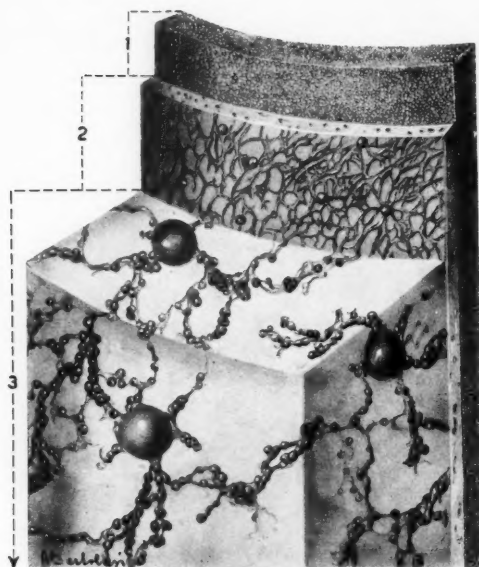


Fig. 8. Digrammatic representation of the wall of the contractile vacuote (Scale of enlargement 1:50,000). — 1 Internal layer (internal Plasmalemma). The number of the globular layers is arbitrary. The order of magnitude of the individual globules corresponds to the scale adopted in this figure. Their globular shape is derived from the electron micrographs. But it cannot be excluded that the globules might possess anisodiametry not demonstrable by the electron microscope. — 2 Intermediate fibrillar layer. The order of magnitude of the fibers and microsome-like bodies correspond to the scale. At the left side of the figure large and regular meshes are represented, at the right side a denser felt of fibers. — 3 External hyaloplasmic layer. The size of the reticular fibers as well as the microsomes correspond to scale of this figure. The width of the meshes is somewhat reduced as well as the diameter of the mitochondria.

Mg-Ions it forms fibrous strands. This leads to the question, whether the fibrous proteins of hyaloplasm and contractile vacuole fibrillar layer resemble more or less myosine. Solation and gelation of

which might act differently according to the functional activity of the c. v. In the beginning of diastole rapid synthesis of membrane might occur, whereas during systole rapid disintegration of the same material might be performed by the same enzyme system.

Until now the structural basis of the rapid contraction process of the c. v. wall, the systole, was not known. The "intermediate layer" now discovered by electronmicroscopy might be considered as the actively contracting system, because it contains a fibrous network and many microsome-like bodies. The fibers might act as contracting elements and the "microsomes" as the necessary metabolic elements. There exist some similarities between this fibrous network of the intermediate layer and the hyaloplasmic reticulum of Amoeba. The dimensions of fibers as well as those of microsomes are very similar. Also the hyaloplasm seems to possess contractility. The hyaloplasm is dissolved in distilled water whereas in presence of Ca- and

hyaloplasmic reticulum as well as the rapid structural transformations of contractile vacuole wall require proteins of high structural plasticity. The properties of myosin-like proteins respond very well to such requirements. There exist furthermore the experiments of Hoffmann-Berling (1954) which are also in favour of the occurrence of myosin-like proteins in fibroblasts and other animal cells. It is of course desirable to accumulate much more evidence in favour of our assumption on the active concentration of the fibrous layer, before it can be regarded as safe.

The outer layer, consisting of gelified fibrous hyaloplasm with microsomes and many mitochondria represents probably also a complex metabolic system, the function of which cannot be clearly stated at this moment. It might be involved in the generally accepted osmoregulatory function as well as in the production of energy-rich compounds, necessary for the contractile layer and the excretory activity.

2. The importance of stabilizing cytoplasmic structures before fixation and the role of different fixing agents

The investigation of the structure of the c. v. wall has met with rather serious difficulties because of the different behaviour of the three layers after treatment with different fixing fluids. The mitochondria are well preserved by osmium tetroxyde. But the fibrous layer, indicated in the living animal by birefringence, is rather incomplete after osmic treatment. Fibers are only partially and microsomes not at all preserved. A satisfactory structural pattern can only be obtained by pretreating the specimens with versene and subsequent fixation by agents containing acetic acid. The same holds for the microsomes of the hyaloplasmic layer.

Accordingly in the case of the c. v. there is as yet no chemical substance or mixture known, which might serve as good universal fixing agent. Osmium tetroxyde is well suited for preserving the mitochondria but does not fix sufficiently the microsomes and fibrous structures. On the contrary the mixtures containing acetic acid preserve well microsomes and fibers but not the mitochondria. Therefore it is necessary, when choosing from different fixing fluids the most suitable one, to take into account the specific chemical properties and macromolecular constituents of the respective cytoplasmic organoids. Recent experiments on caseins (H. R. Wahli) blood plasma (Porter and Kallmann), as well as the observations of Bahr (1954) on amino acids and proteins demonstrate, that osmium tetroxyde reacts with proteins, few amino acids and some unsaturated compounds of fats. This is in accordance with our observations which prove the equivalent preservation of cytoplasmic structures containing proteins and lipoproteins (as mitochondria and food vacuoles of amoeba). As Bahr has shown, *nucleic acids do not react with osmium tetroxyde*. Therefore it is not surprising that structures rich in nucleic acids like chromosomes, micro-

somes, etc. are very badly preserved by OsO_4 . Fixing fluids, containing acetic acid seem to be more suited for cell constituents rich in nucleic acids like microsomes (*Tubifex* eggs, *Amoebae*) and the same seems to be true for actively contracting fibers, like the fibers of the c. v. or the contractile fibers. It is also important to note, that chromate Ions react with nucleic acids (Herrmann and Speck 1954).

But treatment of microsome like bodies by fixing fluids containing acetic acid is not sufficient by itself. In many cases we have observed that bodies rich in RNA are very instable and that they may disintegrate even before the fixing fluid has penetrated the cell in sufficient quantities. This tendency to autolysis can be inhibited by application of the chelating substance versene (Holter, Ottesen and Weber 1953, Bairati and Lehmann 1954). Therefore pretreatment of cytoplasmic structures by versene and fixation by acetic mixtures has given the most satisfactory results (Carnoy, Serra, Bouin and especially Regaud containing chromate with acetic acid). The discussion about the production of artifacts has also been strongly influenced by the changes of *cytoplasmic turbidity*, which are produced by many fixing fluids. The increase in turbidity which occurs in many cases after fixation is regarded as fundamental alteration of cytoplasmic structures accompanied by formation of artefacts. This assumption cannot be considered as entirely justified, if we take into account the recent results on submicroscopic structure of cytoplasm. At least in the case of *Amoeba* and *Tubifex*, the cytoplasm represents a suspension of many individual particles and vesicles (mitochondria, microsomes, vacuoles) in the hyaloplasm, which might be regarded as a highly hydrated reticulum of fibrous protein strands. This hyaloplasmic reticulum easily changes *in vivo* from the gel state to the sol state and vice versa. The differences of refraction between the hyaloplasmic reticulum and the microsomes seem to be very small. As soon as the hyaloplasmic reticulum is condensed and dehydrated the turbidity increases considerably. In this case the delicate state of hyaloplasm is indeed changed profoundly by dehydration and condensation but the microsomes might be preserved very well, as we already have shown. On the contrary, formaline and OsO_4 produce much less turbidity. But also in this case the hyaloplasm is precipitated, but in less condensed form or even disintegrated. The microsomes however are very incompletely preserved. Therefore we cannot find a reliable correlation between degree of turbidity and degree of equivalent preservation of cytoplasmic constituents. The turbidity is produced in first line by the type of condensation of the hyaloplasmic reticulum and the probable disappearance of the interstitial sollike protein solution, replaced by a fixing agent or water, which possesses a quite different refraction index.

V. Summary

1. The liquid contents of the contractile Vacuole of *Amoeba proteus* with a diameter of about 50μ are discharged within about one second. The

authors have studied the fine structure of the c. v. wall with the aim, to find the structural base of this active contraction.

2. The wall of the living as well as the fixed c. v. is birefringent. There exists in the outer wall of c. v. a mainly textural birefringence whereas in the inner layer intrinsic birefringence prevails.

3. Fragments of c. v. wall, fixed by a series of different fixing fluids, show uniformly three layers in the electron microscope: the external layer with mitochondria and numerous hyaloplasmic microsome containing strands, an intermediate layer with felt-like arranged microsome containing fibrils, an internal wall, probably containing mucoproteins, directly attached to the fibrillar layer.

4. The contractile part of the c. v. wall is probably the intermediate fibrillar layer.

5. The importance of different chemical agents for the optimal fixation of the different components of the c. v. wall is demonstrated.

Zusammenfassung

1. Die kontraktile Vakuole (c. v.) von *Amoeba proteus* von 50 μ Durchmesser entleert sich in ca. 1 Sek. Die Verfasser haben den Feinbau der Vakuolenwand untersucht, um eventuell die strukturelle Grundlage dieser aktiven Kontraktion zu finden.

2. Die Wand der lebenden wie der fixierten c. v. ist doppelbrechend. Fixierte c. v. besitzen in der Außenschicht eine Form- und in der Innenschicht eine Eigendoppelbrechung.

3. Fragmente verschieden fixierter c. v.-Wände zeigen im Elektronenmikroskop drei Schichten: eine äußere mitochondrienhaltige mit zahlreichen mikrosomenhaltigen Hyaloplasmasträngen; eine mittlere mit einem Filz von mikrosomenreichen Fibrillen; eine innerste direkt der mittleren Schicht anliegende sehr dünne, vermutlich mucoproteinreiche Haut.

4. Als kontraktiler Anteil kommt vermutlich die fibrilläre mittlere Schicht in Frage.

5. Die Bedeutung verschiedener chemischer Agenzien für die optimale Fixierung der verschiedenen Komponenten der Vakuolenwand wird an Beispielen nachgewiesen.

Résumé

1° — Les Auteurs ont étudié la structure submicroscopique de la paroi de la vacuole contractile (v. c.) chez l'*Amoeba proteus*, pour éclairer la base structurale de la contraction active.

2° — La paroi de la v. c. soit à l'état vivant soit après fixation, est biréfringente négative par rapport à la normale à la surface. La biréfringence totale est en partie biréfringence texturale (surtout dans la couche extérieure) et en partie biréfringence intrinsèque (surtout dans la couche intérieure).

3° — Les examens électroniques (après différentes fixations) des frag-

ments de la vacuole ont permis de reconnaître dans la paroi de la vacuole trois couches; a) la couche extérieure est formée par un hyaloplasme assez gélifié qui contient nombreux mitochondries; b) la couche intérieure, membrane limite de la vacuole, est comparable par sa structure et ses propriétés histochimiques au plasmalemma de l'amibe; c) la couche intermédiaire, assez mince, est formée par un tricot de fibrilles submicroscopiques anastomosées et par des granules comparables aux microsomes.

4° — La systole de la vacuole et l'évacuation du contenu liquide peuvent être expliquées par la contraction des fibrilles de la couche intermédiaire.

5° — Les Auteurs ont envisagé l'importance des différents agents chimiques pour réaliser une parfaite fixation des différentes structures qui composent la paroi de la vacuole.

Bibliography

- Andrésen, N., 1942: Cytoplasmic components in the *Amoeba Chaos chaos* L. C. r. Labor. Carlsberg, Sér. chimique 24, 140—184.
- Bahr, G. F., 1954: Osmium tetroxyde and Ruthenium tetroxyde and their reactions with biologically important substances. *Exper. Cell Res.* 7, 457—479.
- Bairati, A., and F. E. Lehmann, 1951: Diversi costituenti della *Amoeba proteus* (plasmalemma, ialoplasma, vacuoli) esaminati al microscopio elettronico. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* 23, Suppl., 195—207.
- 1953: Structural and chemical properties of the plasmalemma of *Amoeba proteus*. *Exper. Cell Res.* 5, 220—233.
- 1954: Partial disintegration of cytoplasmic structures of *Amoeba proteus* after fixation with Osmium tetroxyde. *Experientia* 10, 173.
- Herrmann, H., and L. B. Speck, 1954: Interaction of chromate with nucleic acids in tissues. *Science* 119, 221.
- Hoffmann-Berling, H., 1954: Adenosintriphosphat als Betriebsstoff von Zellbewegungen. *Biochim. Biophys. Acta* 14.
- Kitching, J. A., 1938: Contractile vacuoles. *Biol. Rev.* 13, 405—444.
- Contractile vacuoles. *Symp. soc. exper. Biol.* 6.
- Lehmann, F. E., 1955: Die submikroskopische Organisation der Zelle. *Klin. Wschr.* 33, 294—300.
- 1955: Nukleinsäurehaltige Cytoplasmapartikel als Objekte cytochemischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen. *Arch. Jul. Klaus-Stiftung* 29, 288.
- and H. R. Wahli, 1955: Modellversuche an Kaseinaten über die äquivalente Fixation submikroskopischer Strukturen. *Exper. Cell Res. Suppl.* Vol. 3.
- Løvtrup, S., and A. Pigon, 1951: Diffusion and active transport of water in the Amoeba. C. r. Labor. Carlsberg, Sér. chim. 28, 1—34.
- Mast, S. O., 1938: The contractile vacuole in *Amoeba proteus*. *Biol. Bull. (Am.)* 74, 306—313.
- and C. Fowler, 1935: Permeability of *Amoeba proteus* to water. *J. cellul. a. comp. Physiol. (Am.)* 6, 151—167.
- and D. L. Hopkins, 1941: Regulation of the water content of *Amoeba mira* and adaption to changes in the osmotic concentration of the surrounding medium. *J. cellul. a. comp. Physiol. (Am.)* 17, 31—48.
- Müller, R., 1936: Die osmoregulatorische Bedeutung der kontraktilen Vakuolen von *Amoeba proteus*, *Zoothamnium hicketes* und *Frontonia marina*. *Arch. Protistenkunde* 87, 340—382.

- Porter, K. R., and Kallmann, 1953: The properties and effects of Osmium tetroxyde as a tissue fixative with special reference to its use for electron microscopy. *Exper. Cell Res.* **4**, 127—141.
- Romeis, B., 1948: *Mikroskopische Technik*. 15. Aufl. Leibniz-Verlag, München.
- Schmidt, W. J.: Polarisationsoptische Erforschung des submikroskopischen Baues tierischer Zellen und Gewebe. *Verh. dtsh. Zool. Ges.* **41**, 303—389. *Zool. Anz. Suppl.*
- Singh, B. N., 1938: The cytology of *Amoeba proteus* "Y" and the effects of large and small centrifugal forces. *Quart. J. microsc. Sci.* **80**, 601—635.
- Wahli, H. R., 1953: Über die submikroskopische Struktur von Kaseinaten sowie des Cytoplasmas von *Tubifex*-Keimen nach verschiedenartiger Fixierung. *Diss. phil.-nat. Fakultät Univ. Bern* (gekürzte Fassung).

Addendum: Since correction of the first proofs of this article E. Manni has studied ultrathin sections of *Amoeba proteus* in our laboratory. The structure of the c. v. wall and plasmalemma in sections appeared to be more similar than we had previously assumed. Both possess a mucous and a fibrillar layer. This required a new critical evaluation of the figures of this publication. The figures 3 and 4 very probably show fragments of the c. v. wall, whereas for the figures 5 to 7 it cannot be decided whether the fragments represent parts of the two layered plasmalemma (Lehmann, Manni and Geiger, *Naturwiss.* **43**, 91, 1956) or of the c. v. wall. Details will be given and discussed in *Rev. Suisse Zool.* Vol. 63 (1956). The diagram of Fig. 8 this publication is not in contradiction to the recent findings on ultrathin sections.

Die Plastiden in den albicaten Geweben der Blätter einer mediovariegaten Form von *Chlorophytum comosum*

Von

S. Strugger und M. Losada-Villasante¹

Aus dem Botanischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster i. W.

Mit 10 Textabbildungen

(Eingelangt am 8. Juli 1955)

Über die Plastiden in den albicaten Geweben der Blätter bunter Rassen liegen Untersuchungen, welche die Erfahrungen der Plastidenforschung der letzten zwanzig Jahre berücksichtigen, nicht vor. Wenn Küster (1927) schreibt: „Die Metamorphose, welche die Chloroplasten beim Verbleichen erfahren, bedarf noch besserer Erforschung“, so besteht dieser Satz auch heute noch voll zu Recht.

Unser bisheriges Wissen über die Plastiden albicater Zellen stützt sich auf die älteren Arbeiten von Dalitzsch (1886), Hassack (1886) und Zimmermann (1890, 1893). Dalitzsch fand bei der Aroidee *Richardia albomaculata* in den Mesophyllzellen der albicaten Zonen farblose Plastiden. Hassack berichtet, daß panaschierte Gewebe „farblose Protoplastmaklumpchen“ in den Zellen erkennen lassen. Wohl die bisher ausführlichste Arbeit stammt von Zimmermann. Er untersuchte eine große Zahl weißbunter Objekte und fand, daß in den albicaten Zellen ganz allgemein scharf begrenzte Plastiden zu beobachten sind, deren Pigmentgehalt wechselnd ist. Von rein weißen bis zu gelben und schwach grünen Plastiden sind alle Übergänge vorhanden. Nur bei wenigen Objekten ist im gealterten Zustande eine Zerstörung der Plastiden zu beobachten. Die Plastiden der albicaten Zellen sind im allgemeinen kleiner als die grünen Zellen desselben Blattes. Als besonderes Charakteristikum vieler Objekte fand Zimmermann eine Vakuolisation der Plastiden. Er konnte mit Sicherheit nachweisen, daß die mit einer oder auch mehreren Vakuolen versehenen Plastiden normalerweise in den albicaten Zellen vorkommen, so daß bei manchen Objekten das Plastidenstroma nur als ringförmige Blase in Erscheinung tritt (*Veronica*, *Pelargonium*). Bei *Aspidistra elatior* fol. var. enthalten die albicaten Zellen kleine Plastiden mit 1 bis 2 Vakuolen. „Bei

¹ Madrid, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Serrano 113.

diesen Chromatophoren war häufig eine stärker grün gefärbte Partie innerhalb der heller gefärbten Grundmasse zu unterscheiden, die gegen dieselbe meist sehr scharf abgegrenzt war.“ Seine Zeichnungen deuten auch darauf hin, daß hier eine stark reduzierte Plastidenform mit einem großen, chlorophyllführenden Granum vorgelegen hat. Zimmermann findet auch bei *Chlorophytum comosum* fol. var. in den albicaten Gewebiszonen das Vorhandensein von bleichen Plastiden.

Nachdem schon Saposchnikoff (1889) zeigen konnte, daß auch in den Zellen panaschierter Blattgewebe nach Zuckerdarbietung ein Störkeaufbau experimentell erzielt werden kann, hat Zimmermann (1895) diese Frage im Zusammenhang mit seinen cytologischen Studien bei den verschiedensten Objekten sehr eingehend geprüft. Er fand, daß in den Plastiden der albicaten Zellen nach Zuckergabe eine Stärkebildung erreicht werden kann. Stärke wird auch noch von den extrem vakuolisierten, ring- oder schaumförmigen, albicaten Plastiden gebildet. Winkler (1898) konnte diese Ergebnisse bestätigen, fand aber bei *Pandanus Veitchii* fol. var. in den albicaten Zellen weder Plastiden noch Stärkebildung nach Zuckergabe. Timpe (1900) konnte diese physiologischen und cytologischen Befunde bestätigen. Kränzlin (1908) untersuchte den Pigmentgehalt albicater Gewebe. Er konnte in den meisten Fällen noch einen nachweisbaren Chlorophyllgehalt feststellen. Tsinen (1923, 1924) führte cytologische und entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an panaschierten Pflanzen durch, welche prüfen sollten, ob die Theorie des chondriosomalen Ursprunges der Plastiden bei albicaten Geweben zu bestätigen sei. Er stellte sich auf den Standpunkt, daß neben albicaten Zellen mit typischen Chondriosomen auch Zellen zu finden seien, welche blasser Plastiden enthalten. Er deutet diese Beobachtungen im Sinne der Chondriosomenlehre. Recht widerspruchsvoll sind die Angaben über die Plastiden albicater Zellen von *Brassica oleracea* var. *acephala*, welche durch Schumacher (1929) und v. Loui (1931) gegeben werden. Schumacher findet mit Recht leukoplastenähnliche Plastiden, welche amöboid aussehen und Vakuolen besitzen, während v. Loui sich durchaus auf den Boden der Chondriosomenlehre stellt und nur gelegentlich von beobachteten Plastiden in den albicaten Geweben spricht. Schwarz (1931) findet, daß albicate Zellen immer Plastiden führen. Diese sind in ihrer Größe reduziert, neigen zu unregelmäßigen Formen und Verklumpungen. Auch ihre Zahl pro Zelle ist reduziert.

Fassen wir das bisher bekannte Material über albicate Plastiden zusammen, so scheint es gesichert zu sein, daß reduzierte Plastiden vorliegen, welche pigmentarm sind, eine amöboide Gestalt besitzen und häufig mehr oder weniger vakuolisiert sind. Über die Verteilung des Chlorophylls liegen nur wenige Angaben vor. Nach Zimmermann könnten gelegentlich vereinzelte pigmentführende Grana erwartet werden. Das Stroma ist zur Stärkeakkondensation noch durchaus befähigt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der cytologischen Analyse der Plastiden der albicaten Blattzonen einer mediovariegaten Form von *Chlorophytum comosum*. Einerseits ist dieses Objekt von Collins (1922) genetisch als ein Fall nicht mendelnder Buntheit mit mütterlicher Ver-

erbung erkannt, und andererseits ist durch die Untersuchungen von Strugger (1953) der Bau der Proplastiden in den embryonalen Zellen ausführlich beschrieben worden. Nach Renner (1936) handelt es sich um eine Albomaculatio, welche dem Streifentypus der Panaschüre der Liliifloren entspricht. Diese mediovariegata Form ist eine haplochlamyde Periklinalchimäre.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden lichtmikroskopisch durchgeführt. Eine elektronenoptische Analyse soll erst nach der Ausschöpfung der lichtmikroskopischen Untersuchungsmöglichkeiten als gesonderte Arbeit folgen.

Alle Untersuchungen wurden mit einem besonders ausgestatteten Ortholuxmikroskop (Leitz) angestellt, welches mit wenigen Griffen eine Umstellung von der Hellfeldmikroskopie zur Fluoreszenzmikroskopie mit einer lichtstarken Quecksilberdampfhochdrucklampe (Philips CS 150) ermöglichte. Neben der Vitaluntersuchung wurde mit 2% Osmiumsäure fixiertes Material mit Säurefuchsinfärbung in Mikrotomserien untersucht. Nur durch die Kombination der intravitalen Hellfeld-, intravitalen Fluoreszenzbeobachtung und der Fixation und Färbung war es möglich, sich ein klares Bild über den Zustand der albicaten Plastiden zu verschaffen.

Die Proplastiden in den Blattmeristemzellen

An sorgfältig geführten Flächenschnitten aus der meristematischen Basis sehr junger Blätter aus der Knospenregion wurden die Proplastiden im

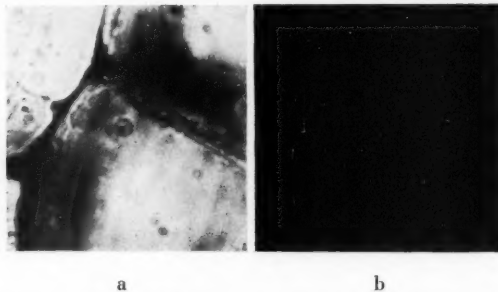


Abb. 1 a. Meristemzelle von der Basis eines sehr jungen Knospenblattes von *Chlorophytum comosum*, in 0,4 molarer Saccharoselösung liegend, *intra vitam* im Hellfelde aufgenommen. Das Proplastid hat eine rundliche Gestalt. Das primäre Granum ist deutlich von der Fläche als runde kleine Scheibe sichtbar. Durchmesser des Proplastids $2,6 \mu$. — Objektiv 1/12 Ölimmersion; Okular 10fach; Ortholux.

Abb. 1 b. Meristemzelle von der Basis eines sehr jungen Knospenblattes in 0,4 molarer Saccharoselösung liegend. Dasselbe Proplastid wie in Abb. 1 a im Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. — Objektiv 1/12 Ölimmersion; Okular 10fach; Ortholux.

Hellfeld und im Fluoreszenzmikroskop vergleichend untersucht. Die Proplastiden entsprechen in ihrer Form und Größe vollständig der von

Strugger (1953) gegebenen Beschreibung. Sie enthalten regelmäßig ein Granum, sind also unigranulär. Abb. 1 a gibt ein im Hellfeld *in vivo* photographiertes Proplastid aus dem Blattmeristem wieder. Das primäre Granum hebt sich gerade noch vom Stroma ab. Dasselbe Objekt im Fluoreszenzlicht wird in Abb. 1 b abgebildet. Das primäre Granum zeigt eine elektive Chlorophyllfluoreszenz. Das Stroma ist dagegen im Fluoreszenzmikroskop nicht deutlich begrenzt nachzuweisen. Heitz und Maly haben (1953) bei *Agapanthus* ebenfalls das primäre Granum als fluoreszierendes Gebilde gesehen, haben aber das Stroma nicht beobachtet, was aus ihren Größenangaben hervorgeht.

Die fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen an den basalen Meristemzellen von *Chlorophytum* haben ergeben, daß Proplastiden mit einem primären Granum regelmäßig nachzuweisen sind, und daß schon auf der Entwicklungsstufe der Blattmeristeme im primären Granum das Chlorophyll fluoreszenzmikroskopisch scharf lokalisiert beobachtbar ist. Es war daher zu vermuten, daß die sich später entwickelnden albicaten Plastiden noch immer in Spuren Chlorophyll führen können.

Hellfelduntersuchungen an albicaten und normalen Plastiden

Von den panaschierten Mittelstreifen erwachsener Blätter wurden in der mittleren Zone an der Blattunterseite Flächenschnitte angefertigt und in Leitungswasser oder in 0,1 molarer Rohrzuckerlösung infiltriert und mit der Schnittfläche nach oben mit einer Fluoritimmersion beobachtet. Neben zweifellos geschädigten Zellen sind jedoch die intakt gebliebenen Mesophyllzellen an der normalen Cytoplasmakonfiguration, am beinahe homogen feinkörnigen Zustand des Zellkernes und am Vorhandensein der Cytoplasmaströmung recht leicht zu erkennen. In den einwandfrei lebenden Zellen waren auch die Sphärosomen und Chondriosomen gut zu beobachten. Die Plastiden sind in relativ geringer Zahl im Plasmawandbelag, aber auch vereinzelt in Plasmasträngen und um den Zellkern deutlich zu sehen. Sie erscheinen bei Hellfeldbeobachtung blaß und haben eine recht wechselnde, amöboide Gestalt. Wenn sie im Wandbelag liegen, so sind sie an der Wandseite abgeflacht und an der Innenseite etwas gewölbt. Sie bieten in der Flächenansicht ein meist anderes Bild als in der Seitenansicht. Ihr Umriss in der Flächenansicht kann länglich lappig oder auch ähnlich einer Amöbe nach mehreren Seiten gelappt erscheinen (vgl. Abb. 2). Bemerkenswert ist das regelmäßige Vorkommen von ein bis mehreren relativ großen, scheibchenförmigen Gebilden, welche im günstigsten Falle auch bei Hellfeldbetrachtung eine blaßgrüne Färbung erkennen lassen. Eine Parallellage zweier blaßgrüner Scheibchen konnte gelegentlich beobachtet werden. Ein weiteres Charakteristikum der bleichen Plastiden ist das häufige Auftreten von einer bis mehreren Vakuolen im Stroma. Diese sind nicht immer vorhanden, aber doch so häufig, daß wir, in Bestätigung der Beobachtungen von Zimmermann (1893), diese Vakuolisierung als normale Erscheinung deuten können. Treten viele Vakuolen auf, so nehmen die Plastiden ein schaumiges Aussehen an.

Vergleicht man die albicaten Plastiden mit den Chloroplasten der grünen Randzone der Blätter, so ergibt sich das in Abb. 3 gezeichnete Bild. Die Chloroplasten von *Chlorophytum* haben einen Durchmesser von



Abb. 2. Albicate Plastiden aus dem Mesophyll eines erwachsenen Blattes.

Abb. 2 a. Unigranuläres Plastid, nicht vakuolisiert, mit amöboid geformtem Stroma und einem großen, schwach grünlich gefärbten Granum. Größte Länge des Plastids 5μ , Durchmesser des Granums etwa 3μ .

Abb. 2 b. Ein albicates Plastid mit drei verschieden großen Grana. Größter Durchmesser des Plastids $6,2\mu$.

Abb. 2 c. Ein albicates Plastid mit fünf Grana und einer Vakuole. Größter Durchmesser des Plastids $7,4\mu$.

$6-8\mu$. In der Flächenansicht sind die zahlreichen grüngefärbten Grana deutlich zu erkennen. In der Seitenansicht ist die Geldrollenstruktur (Strugger 1951) auch an diesem Objekt zu belegen. Die Plastiden

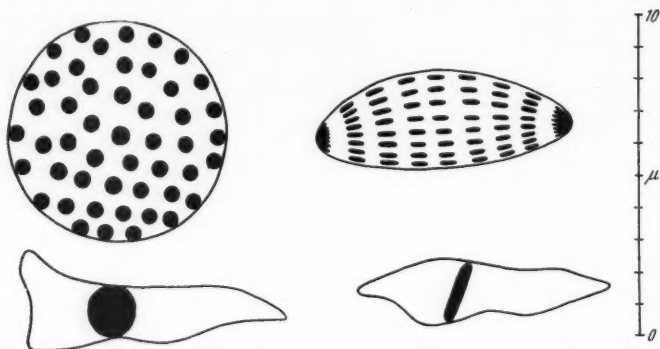


Abb. 3. Oben; normaler Chloroplast aus dem grünen Mesophyll in der Flächen- und Seitenansicht. — Unten; albicate Plastiden aus derselben Zone eines erwachsenen Blattes aus dem weißen Gewebe. Näheres im Text.

der albicaten Zellen desselben Blattes in derselben mittleren Blattregion zeigen dagegen eine sehr primitive Struktur. Im mehr oder weniger regelmäßig gestalteten Stromaleib ist ein $1-2\mu$ großes Granumscheibchen in blaßgrüner Farbe zu erkennen. In der Flächenansicht ist das Granum rund, in der Seitenansicht dick-strichförmig.

Schon diese vergleichenden Beobachtungen lassen erkennen, daß die

albicaten Plastiden offenbar die Metamorphose zum multigranulär gebauten lamellierten Chloroplasten nicht erfahren haben und in einem zwar stark durch Plasmawachstum vergrößerten, aber eindeutig proplastidischen Stadium steckengeblieben sind. Eine Ausbildung von stabileren Lamellensystemen im Stroma ist wahrscheinlich unterblieben, was durch die amöboide Formveränderlichkeit und durch die leichte Deformierbarkeit im Falle der Ausbildung von Vakuolen im Stroma wohl mit Recht vermutet werden kann. Elektronenmikroskopische Untersuchungen müssen aber diese Frage noch klären.

Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen

Flächenschnitte von der Blattunterseite der panaschierten Zone erwachsener Blätter wurden in Leitungswasser, 0,1 molarer Rohrzuckerlösung oder auch in plasmolisierender 0,6 molarer Rohrzuckerlösung infiltriert.

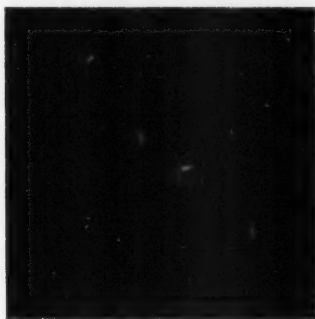


Abb. 4. Albicate Plastiden aus dem Mesophyll der weißen Zone eines erwachsenen Blattes. Mittlerer Blattabschnitt. Fluoreszenzmikroskopische Lebendaufnahme. Eine Gruppe unigranulärer Plastiden, deren Grana eine sehr starke Chlorophyllfluoreszenz erkennen lassen. Auch das Stroma leuchtet diffus rot. Die Vakuolen im Stroma sind deutlich als dunkle Gebilde zu erkennen. — Objektiv 1/12 Ölimmersion; Okular 10fach; Ortholux.

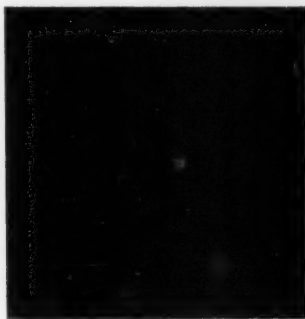


Abb. 5. Flächenschnitt von der Blattunterseite eines erwachsenen Blattes aus der panaschierten Zone des unteren Blattdrittels in 0,6 molarer Saccharose-lösung. Die Zelle war plasmolysiert. Albicates Plastid mit zwei parallel gelagerten, scheibchenförmigen Grana, welche eine deutliche Chlorophyllfluoreszenz zeigen. — Objektiv 1/12 Ölimmersion; Okular 10fach; Ortholux.

Einwandfrei lebende Mesophyllzellen wurden zunächst bei Hellfeldbeleuchtung eingestellt, und dann erfolgte die Umstellung auf die Fluoreszenzmikroskopie. Als Objektiv wurde eine 1/12 Ölimmersion mit Irisblende benutzt. Um die Zellen nicht zu schnell zu schädigen, wurde die Fluoreszenz mit Blaulicht erregt.

Die Mesophyllzellen der albicaten Zone ließen in den meisten Fällen eine sehr deutliche Chlorophyllfluoreszenz ihrer Plastiden erkennen. Dabei fällt bei einer Längsdurchmusterung des Blattes auf, daß von der Basis zur Spitze hin die Intensität der Plastidenfluoreszenz allmählich abnimmt. Wir konnten Material finden, welches im letzten Blattdrittel gelegentlich auch fluoreszenzoptisch keinen deutlichen Chlorophyllgehalt aufwies, doch gehörten solche Blätter zu den Seltenheiten. In der Regel fluoreszieren die albicaten Plastiden sehr stark blutrot. Die mit der Immersion vorgenom-

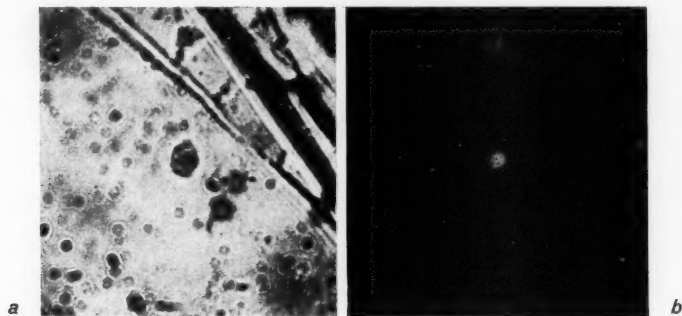


Abb. 6 a. Albicates Plastid aus der weißen Zone des Mesophylls eines erwachsenen Blattes. Mittlere Blattregion. Der Flächenschnitt wurde in 0,2 molarer Saccharose-lösung untersucht. Das Plastid ist unigranulär und das Granum von der Fläche als runde Scheibe zu sehen. Größter Durchmesser des Plastids $5,2 \mu$. — Objektiv 1/12 Ölimmersion; Okular 10fach; Ortholux.

Abb. 6 b. Dasselbe Plastid wie in Abb. 6 a, aber im Fluoreszenzmikroskop photographiert. Das Granum zeigt eine sehr starke Chlorophyllfluoreszenz, während das Stroma nur schwach rot leuchtet. — Objektiv 1/12 Ölimmersion; Okular 10fach; Ortholux.

mene intravitale Untersuchung auf die Verteilung des Chlorophylls innerhalb der albicaten Plastiden ergab das Resultat, daß das Chlorophyll in den Granascheibchen eingelagert ist. Die Abb. 4 zeigt eine Gruppe albicater Plastiden, bei denen die Granascheibchen in der Profilsicht als deutlich fluoreszierende Strukturelemente zu erkennen sind. Abb. 5 zeigt ein lebendes albicates Plastid mit zwei Granascheibchen in der oft zu beobachtenden Parallellage. Durch diese Befunde ist also die Deutung der Einschlüsse, welche *in vivo* auch im Hellfelde zu sehen sind, als Grana gerechtfertigt. Wie aus den Abb. 4 und 5 ersichtlich ist, scheint auch das Stroma-plasma eine wesentlich schwächere Chlorophyllfluoreszenz zu besitzen. Nur die in den Plastiden auftretenden Vakuolen sind in Abb. 4 als dunkle Aussparungen zu erkennen. Die Deutung dieser Beobachtung möchten wir noch offen lassen. Es könnte ein geringerer Chlorophyllgehalt im Stroma dieser Plastiden angenommen werden. Es könnten auch, vom großen Granum ausgehend, im Lichtmikroskop nicht nachweisbare Lamellensysteme sublichtmikroskopischer Dimension existieren, wie sie von *Le y o n* (1954),

Mühlethaler (1955), Perner (1956) neuerdings bei Proplastiden im ersten Ergrünungsstadium von *Chlorophytum* aufgefunden wurden. Diese

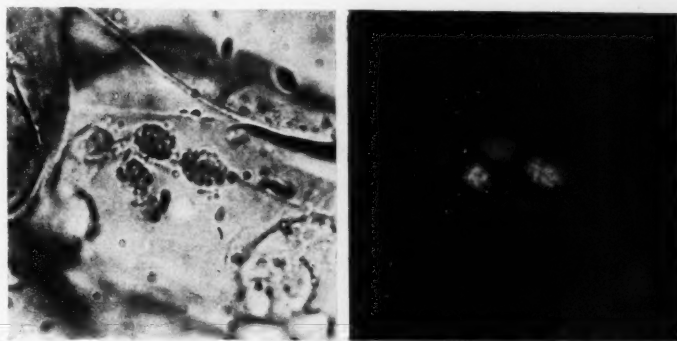


Abb. 7 a. Eine Gruppe multigranulärer albicater Plastiden aus dem Mesophyll der basalen Zone eines alten Blattes. Flächenschnitt in Leitungswasser untersucht. Die Grana sind im Hellfeldbilde deutlich als blaßgrüne Gebilde zu erkennen. —

Objektiv 1/12 Ölimmersion; Okular 10fach; Ortholux.

Abb. 7 b. Dieselbe Plastidengruppe wie in Abb. 7 a im Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die Chlorophyllfluoreszenz der Grana ist deutlich zu beobachten. —

Objektiv 1/12 Ölimmersion; Okular 10fach; Ortholux.

Lamellensysteme könnten als Bildungen des Primärgranums wohl Chlorophyll führen. Es könnte aber auch durch die sehr starke Rotfluoreszenz der

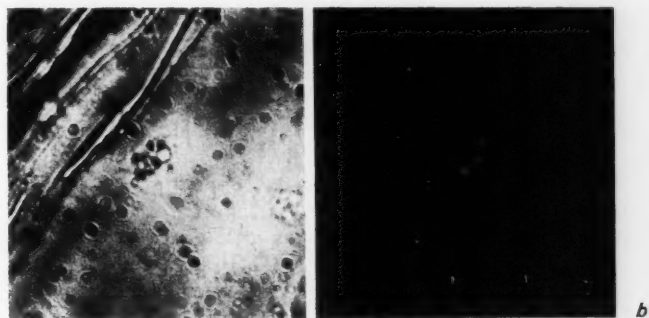


Abb. 8 a. Albicate Plastiden aus dem Mesophyll oberhalb der Basis eines erwachsenen Blattes. Flächenschnitt in 0.2 molarer Saccharoselösung untersucht. Hellfeldaufnahme. Das Plastid enthält fünf Grana und ist deutlich vakuolisiert. — Objektiv 1/12 Ölimmersion; Okular 10fach; Ortholux.

Abb. 8 b. Dasselbe Plastid wie in Abb. 8 a, im Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die Grana zeigen eine elektive Chlorophyllfluoreszenz. — Objektiv 1/12 Ölimmersion; Okular 10fach; Ortholux.

großen Granen eine Lichtbeugung im trüben Medium des Stromaplasmas vorliegen. Alle drei Möglichkeiten müssen ins Auge gefaßt werden. Es ist

aber sicher, daß die Hauptmenge des Chlorophylls im Granum lokalisiert ist.

Durch vergleichende Untersuchungen im Hellfelde und im Fluoreszenzlicht konnte klar belegt werden, daß das fluoreszierende Granum mit den im Hellfelde sichtbaren Gebilden identisch ist. Ein unigranuläres Plastid im Hellfelde und im Fluoreszenzmikroskop zeigen die Abb. 6 a und 6 b.

Von Interesse sind die Befunde, welche darauf hinweisen, daß innerhalb eines erwachsenen Chlorophytumblattes die albicaten Streifen im Mesophyll verschiedenen gebaute Plastiden in gesetzmäßiger Weise enthalten. An der Blattbasis sind die Plastiden multigranulär. Sie führen zahlreiche Grana, wobei aber die typische Geldrollenanordnung der normalen Chloroplasten nicht erreicht wird. Abb. 7 a zeigt eine Gruppe derartiger multigranulärer Plastiden im Hellfelde, und Abb. 7 b bringt von derselben Gruppe eine Fluoreszenzaufnahme. Wird in einiger Entfernung von der Basis untersucht, so nimmt die Zahl der chlorophyllführenden Grana erheblich ab. Abb. 8 a zeigt ein albicates Plastid von amöboider Gestalt mit Vakuolen und mit fünf scheibchenförmigen Grana. Die Fluoreszenzaufnahme in Abb. 8 b zeigt eindeutig die elektive Chlorophyllfluoreszenz der fünf Grana. Gegen die Blattmitte hin sind fast alle Plastiden unigranulär, was bis zur Spitze hin verfolgbar ist. Nur der Chlorophyllgehalt pflegte im Granum dieser Plastiden mit Annäherung an die Spitze stark abzusinken.

Die Auswertung der fixierten und gefärbten Präparate

Mit 2% Osmiumsäure fixierte, weiße Blattabschnitte wurden in Paraffin eingebettet, parallel zur Blattfläche mikrotomiert und mit Säurefuchsin (vgl. Strugger 1954) gefärbt.

Die Untersuchung der Schnittserien ergab sowohl in der Größe als auch in der Form und der Struktur der Plastiden eine völlige Übereinstimmung mit den Beobachtungen *in vivo*. Die Osmiumsäure hat die Plastiden ohne mikroskopisch nachweisbare Artefactbildung konserviert. Das Stroma mit seinen Vakuolen ist auch im fixierten Zustande beobachtbar, ebenso die relativ großen Granascheiben, welche sich in Übereinstimmung mit den Befunden Struggers (1951, 1954) durch eine besonders starke Färbbarkeit gegenüber dem Stroma auszeichnen. Auch die multigranulären Stadien konnten am fixierten Material klar beobachtet werden. Abb. 9 gibt eine Mikraufnahme von einem unigranulären, albicates Plastid mit einem stark gefärbten Granum wieder. In Abb. 10 werden zwei gezeichnete Plastiden dargestellt.

Es kann somit festgestellt werden, daß mit allen drei Methoden der mikroskopischen Untersuchung ein übereinstimmendes Bild von der Struktur der albicaten Plastiden von *Chlorophytum comosum* gewonnen werden konnte.

Diese erbliche Panaschierung entsteht entwicklungsgeschichtlich gesehen so, daß den Proplastiden der späteren albicaten Zellen das Vermögen

zur Metamorphose zum normalen somatischen Chloroplasten wohl direkt oder indirekt verlorengegangen ist. Sie verbleiben im unigranulären Zustande während der Gewebsdifferenzierung, so daß im erwachsenen Mesophyllgewebe die Plastiden unigranulär geblieben sind. Nur die Dimensionen haben sich durch Wachstum geändert. Sowohl der Stromaleib als insbesondere das Granum haben an Größe bedeutend durch Plasmawachstum gewonnen, und recht häufig sind auch Größenschwankungen der Grana (man vergleiche Abb. 2) zu beobachten. Nur an der Blattbasis ist die Entwicklungshemmung weniger stark. Dort führen auch die albicaten Plastiden viele Grana, sie erreichen aber niemals den

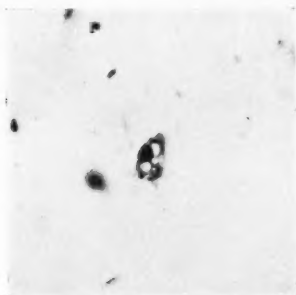


Abb. 9. Mit 2%iger OsO_4 fixiertes Plastid aus der mittleren Blattzone (Mesophyll) eines panaschierten Blattes. Mikrotompräparat. Säurefuchsinfärbung nach Altmann. Das Plastid ist unigranulär. Das runde, scheibchenförmige Granum ist stark gefärbt, während das deutlich vakuolisierte Stroma eine schwache Färbung aufweist. Die Gestalt ist amöboid. Sowohl die Struktur als auch die Umrißformen stimmen mit den Ergebnissen der Vitaluntersuchung völlig überein. — Objektiv 1/14 Fluoritimmersion; Okular 10fach; Ortholux.

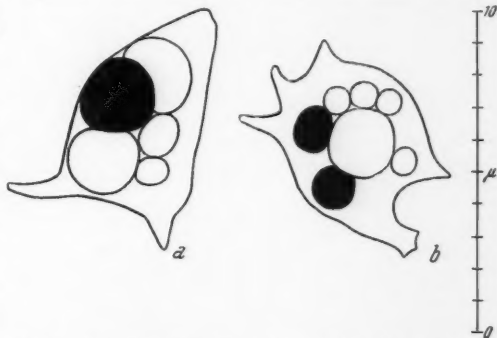


Abb. 10 a. Dasselbe Plastid wie in Abb. 9, gezeichnet.

Abb. 10 b. Ein stark amöboid geformtes albicates Plastid mit zwei Grana und mehreren Vakuolen. Fixiert mit 2%iger OsO_4 , Säurefuchsinfärbung nach Altmann.

hohen Differenzierungsgrad der Chloroplasten normal grüner Mesophyllzellen.

Die Chlorophyllbildung ist prinzipiell nicht gestört. Es fehlen aber die für eine stärkere Chlorophyllbildung und Einlagerung nötigen Strukturen, wie sie im normalen multigranulären Plastid zur Verfügung stehen. Wir können also die albicaten Plastiden von *Chlorophytum comosum* wohl mit Recht als somatisch herangewachsene, unigranuläre oder multigranuläre Proplastiden ansprechen. Ob ihnen das Vermögen zu einer weiteren Entwicklung zum Chloroplasten noch zukommt, kann hier nicht entschieden werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die Plastiden in albicaten Blattzonen von *Chlorophytum comosum* wurden *in vivo* im Hellfeldmikroskop und im Fluoreszenzmikroskop auf

ihre Gestalt, Struktur und ihren Pigmentgehalt untersucht. Parallel dazu wurden albicate Blatteile mit Osmiumsäure fixiert und an Mikrotomschnitten mit Hilfe der Säurefuchsinfärbung das Bild fixierter albicator Plastiden vergleichsweise geprüft.

2. Der Strukturzustand der albicaten Plastiden ist in den mittleren Zonen ausgewachsener Blätter recht einheitlich. Die Plastiden sind unregelmäßig amöboid gestaltet, gegenüber den normalen Chloroplasten reduziert und bestehen aus einem oft vakuolenführenden Stroma und einem relativ großen, scheibchenförmigen Granum, welches mit dem Primärgranum der Proplastiden in den Meristemen identisch ist. Plastiden mit zwei oft parallel gelagerten, großen Granascheiben wurden häufig gesehen. Gegen die Blattbasis hin sind die albicaten Plastiden etwas weiter entwickelt; sie sind dann multigranulär, erreichen aber nicht den hohen Differenzierungsgrad normaler Chloroplasten.

3. Eine Chlorophyllbildung ist auch in den albicaten Plastiden im Fluoreszenzmikroskop nachzuweisen. Das Chlorophyll ist eindeutig und in hoher Konzentration im Granum oder bei multigranulären Formen in den Grana lokalisiert. Das Stroma plasma fluoresziert oft, besonders in der Nähe der Grana, schwach diffus rot, doch konnte nicht eindeutig entschieden werden, ob diese schwache Rotfluoreszenz einem schwachen Chlorophyllgehalt entspricht, oder ob es sich um ein Phänomen der Lichtbeugung handelt.

4. Die Osmiumsäure fixiert die albicaten Plastiden völlig real. Lichtoptisch nachweisbare Artefacte konnten nicht festgestellt werden. Die Bilder der fixierten und gefärbten Präparate bestätigen die *in vivo* gemachten Beobachtungen in allen Einzelheiten. Die großen Granascheiben sind gleich stark färbbar wie die kleinen primären Grana der Proplastiden.

5. Die albicaten Plastiden von *Chlorophytum comosum* sind als entwicklungsgehemmte Plastiden aufzufassen. Die Metamorphose zum multigranulären, hochgeordneten somatischen Chloroplasten ist unterbunden. Sie können daher als herangewachsene, gealterte Proplastiden bezeichnet werden.

Literatur

- Collins, E. J., 1922: Variegation and its Inheritance in *Chlorophytum elatum* and *Chl. comosum*. J. Genet. 12, 1.
- Dalitzsch, M., 1886: Beiträge zur Kenntnis der Blattanatomie der Aroideen. Bot. Zbl. 25, 155.
- Hassack, C., 1886: Untersuchungen über den anatomischen Bau bunter Laubblätter, nebst einigen Bemerkungen betreffend die physiologische Bedeutung der Buntfärbung derselben. Bot. Zbl. 28, 84.
- Heitz, E., und R. Maly, 1953: Zur Frage der Herkunft der Grana. Z. Naturforsch. 8b, 245.
- Kränzlin, G., 1908: Anatomische und farbstoffanalytische Untersuchungen an panaschierten Pflanzen. Dissertation, Berlin.
- Küster, E., 1927: Anatomie des panaschierten Blattes. Linsbauer, Handb. d. Pflanzenanatomie, 2. Abt., 8.
- Leyon, H., 1954: The Structure of Chloroplasts. VI. The Origin of the Chloroplast Laminae. Exper. Cell Res. 7, 609.

- Loui, J. von, 1931: Fluoreszenzmikroskopische und cytologische Untersuchungen über die Frage der Individualität der Plastiden. *Planta* 12, 191.
- Mühlethaler, K., 1935: Im Druck. *Protoplasma* 45.
- Perner, E., 1936: Elektronenmikroskopische Studie zur Frage der „Kristallgitterstruktur“ des Primärgranums von Proplastiden. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* im Druck.
- Renner, O., 1936: Zur Kenntnis der nichtmehlenden Buntheit der Laubblätter. *Flora* 130, 218.
- Saposchnikoff, W., 1889: Die Stärkebildung aus Zucker in den Laubblättern. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 7, 258.
- Schumacher, W., 1929: Über die Beziehungen zwischen Eiweißgehalt und Chloroplastengröße in den Blättern von *Pelargonium zonale*. *Jb. wiss. Bot.* 70, 389.
- Schwarz, W., 1931: Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Panaschierungen. *Z. Bot.* 25, 1.
- Strugger, S., 1931: Die Strukturordnung im Chloroplasten. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 64, 69.
- 1933: Über die Struktur der Proplastiden. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 66, 439.
- 1934: Die Proplastiden in den jungen Blättern von *Agapanthus umbellatus* L'Hérit. *Protoplasma* 45, 120.
- Timpe, H., 1900: Beiträge zur Kenntnis der Panaschierungen. Diss., Göttingen.
- Tsinen, S. J., 1923: Recherches histologiques et cytologiques sur la panachure dans le genre *Abutilon*. *Bull. Soc. Sci. Nancy, sér. IV*, 2.
- 1924: Recherches sur l'histologie des plantes panachées et sur le mécanisme cytologique de la panachure. Thèse, Univ. Nancy.
- Winkler, H., 1898: Untersuchungen über die Stärkebildung in den verschiedenartigen Chromatophoren. *Jb. wiss. Bot.* 32, 525.
- Zimmermann, A., 1890: Über die Chromatophoren in panaschierten Blättern. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 8, 95.
- 1893: Über die Chromatophoren in panaschierten Blättern. Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle, Bd. I.

Aniline Blue and Fluorescence Microscopy of Callose in Bulb Scales of *Allium cepa* L.

By

H. B. Currier and Siegfried Strugger

Department of Botany, University of California, Davis, California,
and Botanisches Institut, Universität Münster

With 6 Figures

(Received July 9, 1955)

1. Introduction

The substance known as "callose" has been identified in plant cells by virtue of its affinity for certain dyes and by its characteristic solubility behavior. Water-soluble aniline blue has long been known to stain callose a clear blue. The dye has been useful in the study of the phloem, where callose especially accumulates in sieve fields. Other stains that are more or less specific for the substance are coralline soda and resorcin blue (Lacmoid), the latter preferred for permanent preparations (Cheddle, Gifford, and Esau 1955).

Water-soluble aniline blue is a product composed of the sodium salts of the triphenylrosaniline- and triphenylpararosaniline-sulfonic acids and the sodium salts of the corresponding disulfonic acids. It is thus an acid dye (anionic) and this is shown by electrophoretic migration methods. Strictly, the name aniline blue is applied to a cationic alcohol-soluble unsulfonated derivative; however, in this report we will use it to mean only the water-soluble product.

It was reported by Arens in 1949 that callose treated with ammoniacal solutions of aniline blue and several related dyes appeared bright yellow under the fluorescence microscope. These dyes do not fluoresce in the solid state or in aqueous solution, but they are sorbed by callose in such a way that a yellow fluorescence in UV is observed. The sensitivity and specificity are greater than are obtainable with bright field staining methods.

While investigating the staining of callose in *Vitis* phloem with the fluorescent method, it was observed that not only callosed areas of sieve elements appeared yellow, but the pit fields in the parenchymatous cells of the phloem also gave a positive reaction. Subsequent testing of *Allium*

cepa bulb scale upper epidermis showed this tissue to be satisfactory material for what we will call the "pit-callose reaction."

The exact composition and structure of callose are poorly known. In only two locations has it been analyzed, in mycelium of *Bornetina corium* (Mangin 1910), and in cystoliths of *Ficus* leaves (Eschrich 1954). In both instances it was shown to be a d-glucose polysaccharide. In the present paper it is pointed out that "callose," to the extent that it can be identified, is more widely distributed and is no doubt of greater importance in cellular function than has hitherto been appreciated.

2. Materials and Methods

The staining solution contained 0.005% Anilinblau, wasserlöslich, and M/15 phosphate (K_2HPO_4 or K_2HPO_4 - K_3PO_4 mixture) in the pH range 8-10. The solution fades to near colorless some time after preparation, and there is no staining in bright field. For killed tissues, pH 10 gave best results but for living tissues pH 8 to 9 was preferable. Higher concentrations of dye were sometimes employed, and in certain tests 0.2 M sucrose was added. The sugar appeared to increase the reaction. The staining time varied from 10 minutes to 24 hours depending on the purpose of the experiment and the plant material used. The pit callose in epidermal segments and sectioned material was clearly stained in 10 minutes. Small rectangular pieces of epidermis about 4×6 mm. were cut with a sharp razor while still on the bulb scale (cf. Strugger 1949). Infiltration with water or experimental solutions facilitated removal and transfer of the pieces into solutions. Cross sections of scale were prepared free hand.

In fixation experiments formalin-acetic-alcohol (FAA) proved satisfactory. It is a mixture of 90 cc. 70% ethanol, 5 cc. glacial acetic acid, and 5 cc. formalin (40% formaldehyde). The length of fixation does not seem to be critical. Observations were made using a Leitz Ortholux fluorescence microscope, where the source of illumination was a Phillips mercury vapor lamp (CS 150).

3. Results

The pit callose in the anticlinal walls of the epidermis was clearly evident as yellow dots or dashes when viewed from above (Fig. 1). The intensity is due to the presence of many yellow dots in the pit fields, which appear in surface view as in Fig. 2. Initially, at least, the middle lamella and primary wall remain unstained and invisible. Later, and under certain conditions, the pit callose may increase in amount, sometimes appearing continuous through the wall, and it may also spread from the pit areas to form what appear to be sheets or plates of encrusting material (Fig. 3). This is especially true of the living cells of the wound border (Wundrand).

Effect of plasmolysis. Subsequent to staining, plasmolysis with M/1 sucrose had no observable effect on the pit callose, indicating that

the yellow fluorescing material in the pit fields was firmly attached to the wall. Plasmolysis prior to staining, where the tissue was immersed in



Fig. 1. The pit-callose reaction in the anticlinal walls of *Allium* epidermis as viewed from above. Ten minutes staining (living) in solution containing 0.005% aniline blue, M/15 phosphate buffer pH 9, and 0.2 M sucrose. Magn. 618X.

the plasmolyzing solution as soon as possible after cutting open the bulb, approximately 30 seconds, decreased the amount of callose as judged by fluorescence intensity, but there was still a positive reaction.

Continued treatment with the aniline blue solution containing additionally M/1 sucrose resulted in the solution in the extraplasmatic space between the cell wall and separated protoplast becoming fluorescent, yellowish to white in color (Fig. 4). A possible interpretation is that this

is a production of callose by the protoplast surface, the particles escaping into the solution, but prevented from leaving the cell by the cell wall.

Low toxicity of aniline blue. In neutral solution concentrations of aniline blue as high as 0.5% were essentially non-toxic. Epidermal segments after 4 days in such a solution (prepared with tap water) were alive. Due to a large molecular size the dye apparently does not easily enter the normal protoplast. However, injured cells do absorb it, and vacuoles then fluoresce bluish. This is observed under conditions of unfavorable pH (9-10).

Wound reaction. The walls of ruptured cells along the wound border of the segments showed only a slight amount of callose, while the first layer of intact cells along this border gave a much greater reaction than did the cells in the center of the segment. This differential response was lacking in plasmolyzed or rapidly fixed cells, and it means that contact of the plasma membrane with the pit field is necessary for at least



Fig. 2. Primary pit fields on the epidermal anticlinal walls as they appear in face view. Ten minutes (living) in 0.005% aniline blue, pH 8.2. Magn. 668X.

a part of the reaction. Wounding by puncturing several cells in the center of an unstained living section with a needle, produced upon staining a

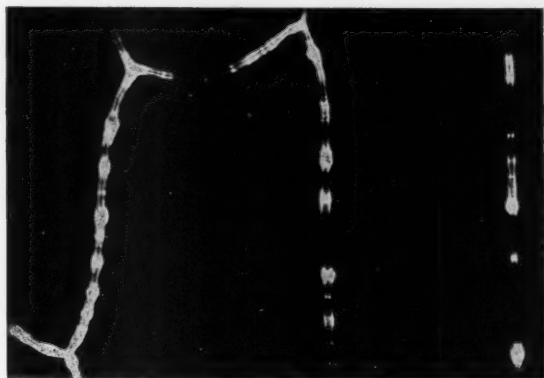


Fig. 3. *Allium* epidermis (living) stained 2 hours with 0.1% aniline blue pH 9, the solution containing 0.2 M sucrose additionally. Callose appears to develop across the middle lamella and to spread along the surface of the wall. Magn. 417 \times .

similar pattern. There was an intensified callose reaction in the cells bordering the wound, with a very slight response in the walls of injured cells (Fig. 5). When the same kind of needle puncture was made in a living



Fig. 4. *Allium* epidermis treated 2 hours with a solution containing 0.5% aniline blue and M/1 sucrose. The extraplasmatic space shows a yellow to white fluorescence. Magn. 115 \times .

section immediately after staining, the response was again the same, but less pronounced than where wounding preceded staining. The wound-callose reaction is interpreted as a labile, reversible enzymatic system.

Fixation experiments. Study of the reaction in living epi-

dermis suggested initially that increased staining occurred with time. It was soon evident, however, that the enhanced fluorescence was due to

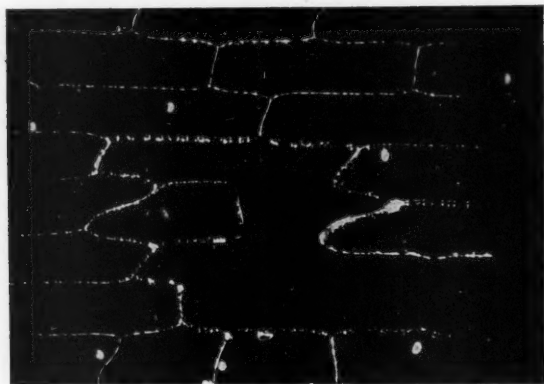


Fig. 5. *Allium* epidermis wounded with a needle, then stained in 0.005% aniline blue solution, pH 9. Photograph after one hour. Pit callose fluorescence is intensified in intact cells surrounding the wound, and reduced in wounded cells, where it can only be faintly observed. Magn. 99 \times .

a greater amount of callose. Killing by fixation with FAA and by immersing in boiling water for 10 minutes permitted the conclusion that the pit callose was normally present, however in smaller amount than

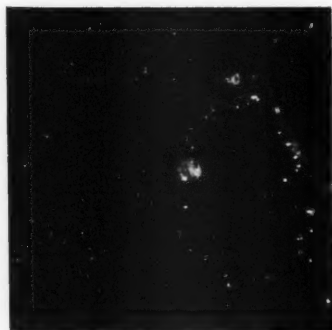


Fig. 6. Cross section of bulb scale showing pit callose reaction in mesophyll cell walls. Stained in 0.005% aniline blue, pH. 9. Magn. 99 \times .

appeared 10 minutes after removal of the epidermal segment from the scale. This is in contrast to many other plant tissues examined, in which the pit callose reaction was not usually observed in rapidly fixed preparations.

The yellow fluorescing material in the pit fields was quite stable to boiling water, to freezing with liquid air, and to fixation with FAA. In addition, it was stable in short time treatment with strong acids and bases.

Age of scale and age of bulb. A more rapid and stronger pit callose reaction occurred in the epidermis of the younger scales than in the older. However, with rapid fixation, the amount of staining material varied in

the reverse direction, *i. e.*, more in the older scales, and it was clearly evident in the epidermal and mesophyll tissues of the dry outer scales. This is in agreement with the general result obtained with many

other kinds of plant tissues—the most rapid wound-callose reaction occurs in the most active cells.

Mesophyll. Cross sections of scale stained in the living condition for 10 minutes clearly showed the pit callose reaction (Fig. 6). Occasional “pegs” and “drops” also were evident both in bright field, where the structures were colorless, and in UV, where the usual yellow fluorescence appeared. Sieve areas in the phloem were bright yellow, and xylem vessels blue, the usual primary fluorescence color of these elements. The presence of callose on the perforated transverse walls of the latex system, located one or two cell layers below the outer epidermis, confirms the observations of Rendle (1889), but its occurrence was variable. In most instances only a few of the perforations showed the substance, and it was a rough unsymmetrical and irregular accumulation, unlike that of the sieve plate. In other instances it was completely absent from the perforated wall.

Solubility tests. Nägeli (1861) and subsequent authors reported that dilute KOH solutions will dissolve callose. After 48 hours, *Allium* epidermis treated with a 1% solution still gave a positive reaction with aniline blue, but it was very weak. Simultaneous tests on *Vitis vinifera* secondary phloem showed a proportionate diminution. A concentration of 5% KOH for 48 hours was more effective, completely eliminating the yellow fluorescence of the pit fields when the epidermis was stained with aniline blue and examined in UV. Saturated CaCl_2 and SnCl_2 solutions were more effective than 1–5% KOH and 24 hours treatment was sufficient to eliminate the callose, based on the failure to show up in the fluorescence method. The pit callose was insoluble in Schweitzers reagent, and this is a prime distinction from cellulose as pointed out by the work of Mangin (1892).

Bright field staining. Since the other cellular structures considered to be callose stain in bright field analysis with aniline blue, coralline soda, and resorcin blue, it was of interest to find that the pit callose in *Allium* epidermis also gives a positive reaction. After killing in IKI (Jod Jod Kalium) solution, and staining 10 minutes with 0.5% aniline blue solution for 10 minutes, a dark blue staining of the pit field surface was apparent at high magnification. The dye also stains, to a degree, the plasmodesmata. Tests using a series of solutions of aniline blue and M/15 phosphate, varying in pH from 4.6 to 10, showed that the greater the blue staining in bright field the less the yellow fluorescence in UV. In the region of pH 6–7, both bright field and UV staining could be observed, although the fluorescence color was more white, or bluish white, than yellow.

4. Discussion and Conclusions

Important in these observations is the demonstration of what appears to be a labile regulating system of general occurrence in plant cells, associated first of all with pit fields and plasmodesmata. Such a reversible system is already known for sieve plate callose, but there it is comparatively slow acting. The rapidity of the reaction in parenchymatous cells is striking.

One must assume that callose is in some way related to the interchange of materials between cells. More specifically, its most obvious function would seem to be a sealing or plugging action. The development of definitive callus on the sieve plate at the cessation of sieve tube activity is believed to interrupt movement. It performs a similar plugging rôle in the pollen tube, in laticifers, and in hairs. In active phloem, callose exists as cylinders surrounding the connecting strands between sieve elements. Here it also may function as a sealing substance, preventing escape of solutes into the cell wall and into the extrafascicular transpiration stream (Strugger 1938, 1939). Such reasoning of course makes it necessary to suppose that the connecting strands lack a differentially permeable surface.

When the parenchymatous pit callose is considered in this light, one must explain its apparent absence in most of the rapidly fixed tissues investigated. Possibly it is there in amounts too small to be detected by the present method. Accumulations that can be seen must be exerting a plugging action.

Callose performs other functions, apparently, in the plant kingdom. It is an important wall constituent of some fungi and of pollen tubes. It may appear in the liquification of pollen-mother-cell walls (Mangin 1889). To what extent it can be considered a general intermediate in the synthesis of the wall is at present uncertain. It is possible that some of the wall thickenings described by Küster (1929, 1951) under the term "Cellulosige Degeneration" may be callose, since these accumulations fluoresce yellow with aniline blue using the present method.

Among early workers, Mangin (1892) especially stressed the view that callose was of quite general occurrence, that in addition to sieve tubes it was present in many other types of plant cells. He reported it in the epidermis, and in parenchyma in the form of irregular deposits distributed, as he describes it, sometimes in a purely accidental manner.

While it cannot be said with certainty that the material in the pits and in other locations is callose substance, there is reason to believe that it is. All of the structures reported as callose give a positive reaction with the new method. Solubility behavior is in agreement. The similarity between sieve field callose and that in pit fields of parenchyma cells is striking. Finally, the stainability of the pit callose in bright field is supporting evidence.

The question as to whether there is a transformation of existing material in the pit region into callose, or whether it is a synthesis of new material, cannot be answered with certainty. The rapidity of the initial pit callose reaction suggests a transformation. Later, in the formation of pegs and sheets of material, this is doubtless an activity of the plasma membrane. Various views as to the mechanism of callose formation in sieve tubes are detailed by Esau (1939).

It is interesting to consider what property of callose makes possible such a selective sorption and fluorescence of a dye that alone is non-fluorescent.

The similarity between the parenchymatous pit callose and the sieve tube callose is further evidence that they are analogues structurally and functionally. Sieve plate callose is then to be considered an extreme development, that in lateral sieve fields intermediate, and the parenchymatous pit callose the basic pattern of occurrence of the substance.

5. Summary

1. The fluorescence-microscopic method is used in which substances of callose nature appear yellow when stained with water-soluble aniline blue.

2. Callose in sieve tubes and in other reported locations is clearly revealed, and it also appears in primary pit fields of parenchyma cells. It is especially evident in the anticlinal walls of *Allium* epidermis.

3. The formation of callose, as judged by intensity of fluorescence, is increased by wound stimulation. Limited at first to pit fields, spreading can occur later.

4. Once formed, the pit callose is stable to plasmolysis, boiling water, and chemical fixation.

5. A major function of callose in plants is considered to be a sealing or plugging action, although there appear to be other functions.

6. The presence of callose in parenchymatous walls is further evidence of the close relationship between sieve fields and primary pit fields.

This work was carried out during the winter of 1954-55 at Münster, where the first author, as a Guggenheim Fellow, was a guest of the Botanisches Institut.

References

- Arens, K., 1949: Provo de calose por meio da microscopia a luz fluorescente e applicacoes do metodo. *Lilloa* 18, 71-75.
- Cheadle, V. I., E. M. Gifford, and K. Esau, 1955: A staining combination for phloem and contiguous tissues. *Stain Techn.* 28, 49-53.
- Esau, K., 1959: Development and structure of the phloem tissue. *Bot. Rev.* 5, 375-432.
- Eschrich, W., 1954: Ein Beitrag zur Kenntnis der Kallose. *Planta* 44, 532-542.
- Küster, E., 1929: Pathologie der Pflanzenzelle. Borntraeger, Berlin.
- 1951: Die Pflanzenzelle. Fischer, Jena.
- Mangin, L., 1889: Observations sur la membrane du grain de pollen mûr. *Bull. Soc. Bot. France* 36, 274-284.
- 1892: Observations sur la présence de la callose chez les phanérogames. *Bull. Soc. Bot. France* 39, 260-267.
- 1910: Nouvelles observations sur la callose. *C. r. Acad. Sci. Paris* 151, 279-285.
- Nägeli, C. W., 1861: Über die Siebröhren von *Cucurbita*. *Sber. bayer. Akad. Wiss.* 1, 212-238.
- Rendle, A. B., 1889: On the vesicular vessels of the onion. *Ann. Bot.* 3, 169-177.
- Strugger, S., 1938: Die lumineszenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchyemen. 1. Mitt. Die Methode und die ersten Beobachtungen. *Flora* 133, 56.
- 1939: Die lumineszenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchyemen. 3. Mitt. Untersuchungen *Helxine Soleirolii* Req. *Biol. Zbl.* 59, 409.
- 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. Springer-Verlag.

Untersuchungen über die antagonistische Wirkung von Mono- und Disacchariden und chemisch nahestehenden Stoffen bei der Wirkung einiger Elektrolyte auf das Pflanzenplasma

I. Mitteilung

Von

Hugo Kaho, Hamburg

Mit 4 Textabbildungen

(Eingelangt am 22. Juli 1955)

Neutralsalze

Es ist schon lange bei anorganischen Salzen bekannt, daß die sogenannten reinen Lösungen, d. h. Lösungen, die nur ein Salz enthalten, für Pflanzenzellen giftig sind und sie in kurzer Zeit abtöten. Die Anwesenheit anderer Ionen, insbesondere der zweiwertigen Ionen, hebt die toxische Wirkung der reinen Lösungen auf, und die Pflanzenzellen wachsen normal. Dieser gegenseitige Einfluß der Salzionen wurde als antagonistische Wirkung genannt und zuerst von J. Loeb um die Jahrhundertwende bei den Eizellen von *Fundulus* entdeckt und später von Osterhout auch bei Pflanzenzellen nachgewiesen. Die Literatur über dieses Phänomen ist seitdem enorm angewachsen. In dieser Beziehung verweise ich auf die klare Zusammenstellung bei R. Höber (1924, 1947).

Über eine antagonistische Wirkung¹ der Anelektrolyte bei der Wirkung der Salze auf Pflanzenzellen sind in der Literatur fast keine Angaben vorhanden, ausgenommen einige wenige Befunde, aus welchen indirekt gefolgert werden kann. Von diesen wird an geeigneter Stelle die Rede sein. Ich habe untersucht, in welchem Maße Mono-, Disaccharide und mehrwertige Alkohole beim Pflanzenplasma die Wirkung von Salzen, Säuren und Laugen antagonistisch beeinflussen.

Die Versuche wurden mit Flächenschnitten von Rotkohlblättern und *Rhoeo discolor* durchgeführt. Die Methode ist in meinen früheren Arbeiten näher beschrieben worden (1921, 1923, 1933). Sie besteht, kurz gesagt, darin, daß in jede zu untersuchende Lösung ca. 100–120 gleiche kleine Schnitte

¹ Im folgenden mit a. W. abgekürzt.

gelegt (1 mm²), in gewissen Zeitabschnitten je 10 herausgenommen, auf 10 Min. in Leitungswasser gebracht und nachher in einem hypertonischen ausgeglichenen Plasmolytikum plasmolysiert werden. Alle plasmolysefähigen Zellen wurden für lebend gehalten. Auf diese Weise wurde der Prozentsatz der lebenden Zellen ermittelt.

Die Versuche wurden serienweise gleichzeitig angestellt, so daß die Ergebnisse einer jeden Tabelle bei den gleichen Versuchsbedingungen erhalten wurden. Die in den Tabellen angegebenen Zucker- bzw. Alkoholgengen wurden den Salzlösungen in substantia zugesetzt. Die molaren Konzentrationen der Zucker beziehen sich auf die Zuckermengen in den Lösungen. Alle Chemikalien wurden von Merck bezogen.

Rhodanide

Tabelle 1.

Rotkohl. KCNS 0,75 mol + Saccharose; Temp. 20°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	KCNS 0,75 mol (Kontroll- vers.)	do + ¹ Saccharose					
		0,01 mol ²	0,05 mol	0,1 mol	0,3 mol	0,6 mol	1,0 mol
		Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten					
30 Minuten	90	100	100	100	100	100	100
1 Stunde	70	80	77	97	93	98	98
2 Stunden	40	53	58	78	90	97	100
3 "	23	45	27	55	75	90	92
4 "	10	20	30	50	78	90	95
5 "	5	8	23	25	67	73	93
7 "	0	0	10	20	48	82	95
9 "	0	0	5	8	32	85	92
11 "	0	0	0	0	43	73	95
14 "	0	0	0	0	42	52	83
24 "	0	0	0	0	13	42	62
Mittelwert (%)	22	28	30	39	62	80	82

¹ „do“ bedeutet in allen Tabellen das Kontrollsalz (hier KCNS) in derselben Konzentration wie im Kontrollversuch.

² Die Konzentration des Zuckers im Gemisch.

Der Mittelwert zeigt die a. W. eines Zuckers schon deutlich an, wenn der Prozentsatz der lebenden Zellen mindestens um 10% höher als der des Kontrollversuches ist, alle Zeitabschnitte der Versuchsserie dabei eingerechnet. (In der Tab. 1 stets 11 Zeitabschnitte.)

Alle Wörter, die sich im Text öfters wiederholen, sind abgekürzt, und zwar: Xylose = Xyl., Arabinose = Arab., Glukose = Gluk., Fruktose = Frukt., Saccharose = Sacch., Maltose = Malt., Laktose = Lakt., Raffinose = Raff., antagonistische Wirkung = a. W.

Der Kontrollversuch der Tab. 1 zeigt, daß die Zellen in der Kalium-rhodanidlösung schnell absterben. Nach 5 Stunden sind noch ca. 5% am

Leben, nach 7 Stunden sind alle tot. Eine Zuckermenge von 0,01 bis 0,05 mol hat auf die Salzwirkung einen sehr kleinen oder fast keinen Einfluß. Bei

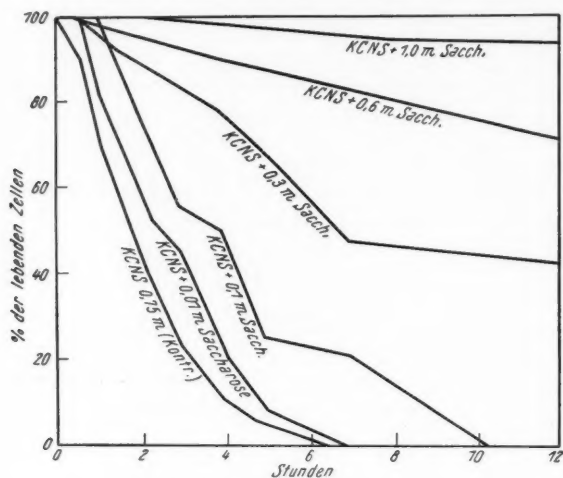


Abb. 1.

0,1—0,3 mol des Zuckers kommt erst die a. W. schon deutlich zum Vorschein, noch klarer bei 0,5 bis 1,0 mol (s. auch die Abb. 1).

Tabelle 2.

Rotkohl. KCNS 0,8 mol + Disaccharide; Temp. 20°, pH 6,5¹.

Einwirkungszeit der Lösungen	KCNS 0,8 mol (Kontrollv.)	do + Laktose 0,1 mol	do + Saccharose 0,1 mol	do + Maltose 0,5 mol	do + Laktose 0,5 mol	do + Saccharose 0,5 mol
	Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten					
30 Minuten	90	100	100	100	100	100
1 Stunde	85	90	95	100	98	95
2 Stunden	60	83	77	87	90	98
3 „	32	60	50	70	80	93
4 „	30	55	40	58	85	95
5,5 „	20	40	12	35	85	62
7 „	0	25	6	30	80	73
9 „	0	13	0	25	28	35
Mittelwert (%)	40	58	48	63	81	81

¹ Wo nicht anderes erwähnt ist, bezieht sich pH auf alle in einem Versuch angewendeten Lösungen.

Aus diesen Versuchen ist zu ersehen, daß 1. die a. W. der Saccharose gegen Kaliumrhodanid, das zu den starken Plasmagiften gehört, in den

Gemischen KCNS + Saccharose deutlich wird und 2. die a. W. mit der Erhöhung der Konzentration des Zuckers zunimmt.

Tabelle 3.

Rotkohl. KCNS 0,9 mol + Monosaccharide und Mannit; Temp. 20°, pH 6,6.

Einwirkungszeit der Lösungen	KCNS 0,9 mol (Kontrollv.)	do +	do +	do +	do +	do +
		Glukose	Fruktose	Mannose	Mannit	Galaktose
		Alle Zucker und Mannit 0,7 mol				
Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten						
30 Minuten	80	100	100	100	100	100
1 Stunde	60	100	100	98	100	100
1,5 Stunden	35	90	88	83	100	100
2 „	10	80	75	75	100	100
3 „	0	87	57	40	93	97
5 „	0	85	32	33	70	53
7 „	0	28	10	42	52	30
9 „	0	7	5	8	33	7
Mittelwert (%)	23	72	58	60	81	73

Ein Vergleich der a. W. der Disaccharide (Tab. 2) zeigt, daß in diesem Versuch Maltose, Laktose und Saccharose ungefähr in gleicher Weise antagonistisch wirken, Maltose gegebenenfalls etwas schwächer. Wir werden aber ferner sehen, daß die a. W. der Zucker wie auch alle biologischen Vorgänge Schwankungen unterliegt und sich aus einer größeren Menge der Versuche als eine Durchschnittsgröße ermitteln läßt. Die Versuche mit den Disacchariden zeigen, daß im Durchschnitt die Konzentration 0,5 mol eine stärkere a. W. als 0,1 mol hat.

Die Monosaccharide Glukose, Mannose, Galaktose sowie die Fruktose zeigen eine deutliche a. W. gegen das Kaliumrhodanid. In gleicher Weise ist beim Mannit die a. W. in dieser

Versuchsserie sogar etwas größer als bei den Hexosen (vgl. Abb. 2). Im Verhalten der Aldosen und der Ketose ist kein Unterschied.

Ferner kamen zur Verwendung noch andere Rhodanide. In der Tab. 4 ist das Verhalten der Zucker gegen das Natriumrhodanid angeführt.

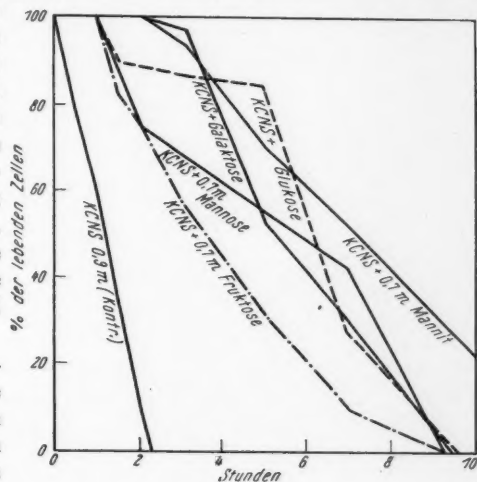


Abb. 2.

Die Versuchsserie der Tab. 4 zeigt, daß die Disaccharide Saccharose und Maltose in diesen Versuchen eine weit überlegene a. W. in Vergleich zur

Tabelle 4.

Rotkohl. NaCNS 0,85 mol + Zucker; Temp. 20°, pH 6,2.

Einwirkungszeit der Lösungen	NaCNS 0,85 mol (Kontrollvers.)	do + Glukose	do + Saccharose	do + Maltose
		Alle Zucker 0,6 mol		
		Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten		
30 Minuten	100	100	100	100
1 Stunde	87	93	100	100
2 Stunden	42	90	100	100
2,5 „	37	92	100	100
3 „	17	85	100	100
3,5 „	15	79	100	100
4 „	10	72	100	100
5 „	0	82	100	100
6 „	0	37	100	100
16 „	0	7	50	40
Mittelwert (%)	31	74	95	94

Glukose haben. Wir werden in weiteren Versuchen sehen, daß Disaccharide im allgemeinen eine größere a. W. haben als Monosen, die Unterschiede sind

Tabelle 5.

Rotkohl. NH_4CNS 0,5 mol; Temp. 20°.

Einwirkungszeit der Lösungen	NH_4CNS 0,5 mol (Kontrollv.)	do + Fructose 0,3 mol, pH 6,2	do + Saccharose 0,3 mol, pH 6,1	do + Sorbit 0,3 mol, pH 6,2	do + Glycerin 0,3 mol, pH 6,2
		Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten			
30 Minuten	100	100	100	100	100
1 Stunde	97	95	98	95	87
2 Stunden	78	92	82	72	65
3 „	62	73	62	28	28
4 „	42	70	35	25	20
5 „	17	25	12	7	8
24 „	0	0	0	0	0
Mittelwert (%) aus 0,5—5 Stdn.	66	76	65	54	51

aber in der Regel nicht so groß wie in den vorliegenden Versuchen (Tab. 4). Das Verhalten der Zucker gegen NaCNS ist dem gegen Kaliumrhodanid ziemlich ähnlich. Ein abweichendes Resultat ergaben die Versuche mit dem Ammoniumrhodanid (Tab. 5). Gegen das Ammoniumrhodanid haben die

untersuchten organischen Verbindungen keine a. W. (ausgenommen Fruktose, Tab. 5). Es scheint uns, daß das Sorbit, insbesondere Glycerin, die schädliche Wirkung des NH_4CNS hier noch verstärken.

Tabelle 6.

Rhodo discolor. NH_4CNS 0,1 mol; Temp. 19°, pH 6,0.

Einwirkungszeit der Lösungen	NH_4CNS 0,1 mol (Kontrollv.)	do + Erythrit	do + Sorbitose	do + Maltose	do + Raffinose
		0,15 mol			
		Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten			
1 Stunde	100	100	100	100	100
2 Stunden	95	95	93	95	97
4,5 „	70	82	90	95	88
8 „	62	65	73	77	75
11 „	27	12	17	37	63
20 „	10	7	20	22	32
Mittelwert (%)	61	60	66	71	76

Ein Versuch mit *Rhodo discolor* (Tab. 6) zeigt, daß der vierwertige Alkohol Erythrit und auch die Sorbitose keine a. W. gegen das NH_4CNS haben (vgl. Tab. 5), die Maltose und das Trisaccharid Raffinose wirken

Tabelle 7.

Rotkohl. $\text{Ca}(\text{CNS})_2$ 0,8 mol; Temp. 20°, pH 6,2.

Einwirkungszeit der Lösungen	$\text{Ca}(\text{CNS})_2$ mol (Kontrollversuch)	do + Saccharose	do + Glycerin
		0,7 mol	
		Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten	
30 Minuten	100	100	100
1 Stunde	60	100	67
1,5 Stunden	40	100	42
2 „	20	100	20
2,5 „	17	100	18
3 „	10	95	5
4 „	0	80	0
5 „	0	92	0
Mittelwert (%)	31	96	31

schwach antagonistisch. NH_4 -Salze sind weitgehend hydrolysiert, NH_3 dringt schnell in die Zellen ein und bewirkt den Umschlag der rötlichen Farbe des Anthozyans in die blaue und gleichzeitig auch eine erhöhte Permeabilität der Zelle für gelöste Stoffe.

Die Saccharose hat in dieser Versuchsserie eine beachtliche a. W. gegen das Calciumrhodanid (Tab. 7). Das Glycerin ist wirkungslos.

Jodide

Aus der Tab. 8 ist zu ersehen, daß die beiden Monosaccharide Xylose und Fruktose eine ungefähr gleiche a. W. gegen das NaJ haben. Die Maltose

Tabelle 8.

Rotkohl. NaJ 0,9 mol; Temp. 19°, pH 6,0.

Einwirkungszeit der Lösungen	NaJ 0,9 mol (Kontrollv.)	do + Xylose	do + Fruktose	do + Maltose	do + Raffinose
		Alle Zucker 0,2 mol			
		Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten			
30 Minuten	85	100	100	100	100
1 Stunde	60	72	75	93	100
2 Stunden	42	70	73	95	100
3 "	53	42	57	65	100
6 "	25	38	30	36	93
12 "	17	50	32	34	95
24 "	0	32	27	45	78
Mittelwert (%)	40	58	56	67	95

und Raffinose wirken dagegen in dieser Beziehung stärker. Man kann sagen, daß die Wirkung mit der Zahl der OH-Gruppen in den Zuckern zunimmt.

Tabelle 9.

Rotkohl. KJ 0,7 mol; Temp. 20°, pH 6,0.

Einwirkungszeit der Lösungen	KJ 0,7 mol (Kontrollv.)	do + Xylose	do + Mannose	do + Saccharose	do + Maltose
		0,5 mol		0,2 mol	0,7 mol
		Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten			
30 Minuten	90	100	100	100	100
1 Stunde	57	80	90	90	100
2 Stunden	63	90	75	80	100
3 "	52	70	72	70	97
5 "	50	45	55	45	45
9 "	30	40	65	62	47
22 "	0	12	43	45	30
Mittelwert (%)	49	62	71	70	74

Aus Tab. 9 ist ersichtlich, daß die Xylose in dieser Versuchsserie schwächer als die anderen Zucker antagonistisch wirkt. 0,5 mol Mannose hat hier annähernd dieselbe a. W. wie 0,2 mol Saccharose. Die Konzentration der Maltose (0,7 mol) ist hier viel höher als die der Saccharose. Die beiden Zucker haben aber eine fast gleiche a. W.

Bromide

Die Tab. 10 zeigt, daß die Zucker auch gegen Bromide antagonistisch wirken. Bromide sind für das Pflanzenplasma weniger giftig als Rhodanide

Tabelle 10.

Rotkohl. NaBr 1,0 mol; Temp. 20°, pH 6,1.

Einwirkungszeit der Lösungen	NaBr 1,0 mol (Kontrollv.)	do + Arabinose	do + Fructose	do + Saccharose	do + Maltose
		Alle Zucker 0,5 mol			
		Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten			
1 Stunde	100	100	100	100	100
6 Stunden	83	90	100	100	100
10 "	50	87	100	100	100
21 "	38	90	98	100	100
28 "	27	82	97	87	92
34 "	10	70	95	90	87
46 "	0	82	95	90	92
56 "	0	55	90	60	80
Mittelwert (%)	38	82	97	91	94

und Jodide. Obwohl in diesem Versuch eine hohe Konzentration angewendet wurde, sterben die Zellen im Kontrollversuch erst nach zwei Tagen ab. Die Fructose und die zwei Disaccharide haben eine ziemlich gleiche a. W., die Arabinose wirkt etwas schwächer (s. Abb. 3).

Mit einer anderen Versuchspflanze (*Rhoeo discolor*, Tab. 11) tritt die a. W. der Zucker gegen KBr nicht so deutlich hervor. Die Versuchsergebnisse liegen hier fast an der Grenze des Versuchsfehlers.

Gegen das NH_4Br ist a. W. der untersuchten Disaccharide und des Trisaccharids nicht so einheitlich wie gegen die anderen Salze. In der vorliegenden Versuchsserie (Tab. 12) ist die Maltose völlig unwirksam, während die Laktose, Saccharose und Raffinose eine schwache a. W. zeigen.

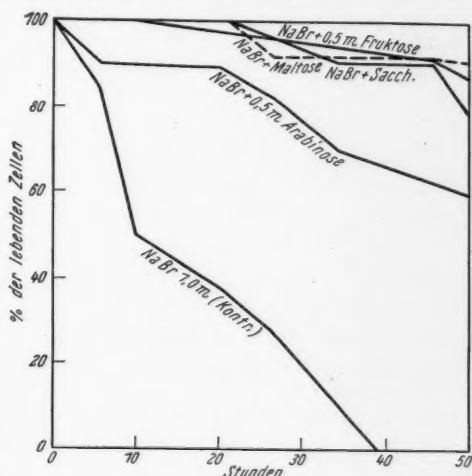


Abb. 3.

Tabelle 11.

Rhodo discolor. KBr 0,2 mol; Temp. 20°, pH 6,2.

Einwirkungszeit der Lösungen	KBr 0,2 mol (Kontrollver.)	do + Xylose	do + Sorbitose	do + Saccharose
		Alle Zucker 0,2 mol		
		Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten		
30 Minuten	100	100	100	100
1 Stunde	78	92	87	90
2 Stunden	72	90	80	67
5 "	60	83	67	85
10 "	57	68	70	80
22 "	62	70	65	82
35 "	17	10	32	22
Mittelwert (%)	63	73	71	75

Tabelle 12.

Rotkohl. NH_4Br 1,0 mol; Temp. 19°, pH 6,2.

Einwirkungszeit der Lösungen	NH_4Br 1,0 mol (Kontrollv.)	do + Laktose	do + Sacharose	do + Maltose	do + Raffinose
		Alle Zucker 0,3 mol			
		Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten			
1 Stunde	100	100	100	100	100
2,5 Stunden	100	100	100	100	100
5 "	95	97	97	97	100
9 "	92	98	100	100	100
20 "	57	87	82	45	93
25 "	35	78	80	38	85
Mittelwert (%)	80	93	93	80	93

Versuche mit vorbehandelten Schnitten

Es wurden noch Versuche in der Weise angestellt, daß dem Kontrollsalz die Zucker nicht unmittelbar zugesetzt, sondern die Schnitte in reinen Zuckerlösungen eine Zeitlang gehalten, mit Filtrierpapier schnell getrocknet und dann in reine Kontrollsalzlösungen übertragen wurden. Solche vorbehandelte Schnitte zeigen eine größere Resistenz gegen schädliche Salzwirkung als gewöhnliche Schnitte. Die Tab. 13 zeigt die Ergebnisse eines solchen Versuches. Fünf Portionen Schnitte wurden auf 20 Stunden in 0,2 mol Lösungen von Arabinose, Sorbose, Sorbit, Saccharose und Maltose gelegt, in jede Zuckerlösung eine Portion; die sechste Portion wurde, als Kontrolle, nicht vorbehandelt.

Die Versuchsserie mit der Vorbehandlung der Schnitte (Tab. 13) zeigt, daß es genügt, wenn die Schnitte einige Zeit mit Zuckerlösungen in Berüh-

rung gewesen sind, um später eine erhöhte Resistenz gegen Salze zu erhalten. Der durchschnittliche Prozentsatz der lebenden Zellen beträgt nach

Tabelle 13.

Rhodo discolor. NaBr 0,4 mol; Temp. 20°, pH 6,2.

Einwirkungszeit der Lösungen	NaBr 0,4 mol (Kontrollv.)	Vorbehandelt mit				
		Arabinose	Sorbose	Sorbit	Saccharose	Maltose
		0,2 mol 20 Stunden				
		Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten				
30 Minuten	100	100	100	100	100	100
1 Stunde	95	95	97	98	100	100
2 Stunden	70	85	92	98	100	100
4 „	50	70	65	93	32	82
6 „	25	75	42	63	72	92
11 „	22	75	67	85	65	92
24 „	32	55	85	77	70	82
36 „	0	3	17	37	24	68
Mittelwert (%)	49	70	71	81	70	90

36 Stunden im Vergleich zum Kontrollversuch (49%) bei den vorbehandelten Schnitten: mit der Maltose 90%, Sorbit 81% und Arabinose, Sorbose, Saccharose ca. 70%.

Tabelle 14.

Rhodo discolor. Alles wie in der Tab. 13, die Schnitte nur 1 Stde. vorbehandelt.

Einwirkungszeit der Lösungen	NaBr 0,4 mol (Kontrollv.)	Vorbehandelt 1 Stunde mit 0,2 mol				
		Arabinose	Sorbose	Sorbit	Saccharose	Maltose
		Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten				
30 Minuten	100	100	100	100	100	100
1 Stunde	70	82	72	87	72	85
2 Stunden	42	83	75	65	62	72
4 „	38	77	48	77	45	80
6 „	20	57	80	68	58	68
11 „	10	60	32	62	52	80
24 „	7	40	35	17	18	62
36 „	0	12	20	20	0	35
Mittelwert (%)	36	64	58	62	51	73

Versuche mit einer anderen Pflanze zeigen, daß schon nach einer Stunde Vorbehandlung mit den Zuckern eine a. W. auftritt (Tab. 14).

Die Tab. 14 und die Kurven der Abb. 4 zeigen, daß schon eine einstündige Vorbehandlung mit den Zuckern und dem Sorbit ungefähr dieselbe

a. W. zur Folge hat wie etwa eine 20stündige. Die Saccharose wirkt dabei schwächer gegen das NaBr als das Sorbit und die Zucker.

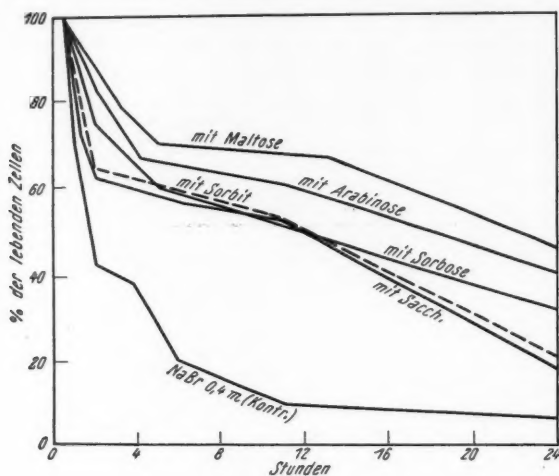


Abb. 4.

Mit Zuckern 1 St. vorbehandelte Schnitte von *Rhoeo* in 0,4 mol NaBr.

Nitrate

Tabelle 15.

Rotkohl. NaNO_3 0,95 mol; pH 6,2.

Rhoeo discolor. NaNO_3 0,5 mol; Temp. 20°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	NaNO ₃ 0,95 mol (Kontrollv.)	do + Sorbit	do + Sacch.	do + Maltose	NaNO ₃ 0,5 mol (Kontrollv.)	do + Xylose 0,3 mol	do + Sorbitose 0,2 mol	do + Laktose 0,1 mol	do + Raffinose 0,1 mol.
		0,5 mol							
	Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten								
1 Stunde	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6 Stunden	85	98	97	100	—	—	—	—	—
10 „	60	100	100	100	97	97	95	100	100
21 „	45	95	97	97	52	48	53	55	78
28 „	12	95	95	97	30	35	27	60	65
34 „	5	95	70	92	22	17	7	47	62
46 „	0	97	85	92	0	0	0	10	37
56 „	0	95	78	95	—	—	—	—	—
Mittelw. (%)	38	97	90	97	50	50	47	62	74

In der vorliegenden Versuchsserie (Tab. 15) tritt beim Rotkohl die a. W. des Sorbits, der Saccharose und Maltose klar hervor, bei den *Rhoeo*-Zellen dagegen ist sie nur bei den höheren Zuckern Laktose und Raffinose zu bemerken. Die Monosaccharide Xylose und Sorbitose sind in diesen Versuchen

unwirksam. Solche Fälle kommen aus noch ungeklärten Gründen ab und zu (nicht so oft!) vor. Wir werden unten sehen, daß die a. W. der Zucker auch gegen Nitrate in gleichem Maße wie gegen Bromide besteht.

Tabelle 16.

Rotkohl. LiNO_3 1,0 mol; Temp. 18°, pH 6,4. *Rhoeo discolor* KNO_3 0,3 mol; pH 6,2.

Einwirkungszeit der Lösungen	LiNO_3 1,0 mol (Kontrollv.)	do + Xylose	do + Maltose	KNO_3 0,3 mol (Kontrollv.)	do + Erythrit	do + Sorbit
	0,5 mol			0,3 mol		
	Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten					
1 Stunde	—	—	—	98	100	100
3 Stunden	100	100	100	95	100	100
6 „	100	100	100	—	—	—
19 „	37	55	95	82	83	92
25 „	23	43	95	—	—	—
32 „	17	35	87	45	75	60
42 „	0	40	90	53	75	62
54 „	0	35	80	52	60	63
70 „	0	8	27	25	50	40
Mittelwert (%)	35	52	84	64	77	74

Die Daten der Tab. 16 zeigen, daß die Xylose und die Maltose gegen das LiNO_3 eindeutig antagonistisch wirken, die Pentose freilich schwächer als das Disaccharid, in gleicher Weise wirken auch die polyvalenten Alkohole

Tabelle 17.

Rotkohl. KNO_3 0,9 mol; Temp. 21°, pH 6,2.

Einwirkungszeit der Lösungen	KNO_3 0,9 mol (Kontrollv.)	do + 0,5 mol	do + 1,0 mol	do + 1,5 mol	do + 2,0 mol
	Glycerin				
	Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten				
1 Stunde	100	100	100	100	100
4 Stunden	82	62	67	65	75
8 "	47	70	70	82	60
14 "	52	60	72	65	68
24 "	82	50	60	42	73
37 "	78	40	50	60	62
49 "	40	45	42	45	40
61 "	18	20	22	5	12
Mittelwert (%)	63	56	60	58	61

gegen das KNO_3 . Das Erythrit hat vier OH-Gruppen. Es ist interessant zu untersuchen, ob auch Glycerin (mit drei OH-Gruppen) eine a. W. hat. Dieses zeigt uns die Tab. 17.

Glycerin zeigt keine a. W. gegen das KNO_3 (Tab. 17). In kleineren Konzentrationen (bis 2,0 mol) scheint es ziemlich indifferent zu sein. Glycerin

Tabelle 18.

Rotkohl. NH_4NO_3 0,6 mol bzw. 0,9 mol; Temp. 18°, pH 6,2.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	NH ₄ NO ₃ 0,6 mol (Kontrv.)	do + Sorbit 0,6 mol	do + Frukt. 0,2 mol	do + Maltose 0,1 mol	do + Sacch. 0,6 mol	NH ₄ NO ₃ 0,9 mol (Kontrv.)	Vorbehandelt 13 Stunden mit			
							Laktose 0,3 mol	Glukose 0,6 mol	Sr(NO ₃) ₂ 0,1 mol pH 6,2	MgSO ₄ 0,1 mol pH 6,0
							Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten			
30 Minuten	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1 Stunde	80	95	97	—	100	87	98	100	98	90
2 Stunden	—	—	—	—	—	82	100	100	97	82
4 „	70	100	78	95	100	52	97	87	92	57
5 „	—	—	—	—	—	70	90	75	85	25
8 „	57	68	67	60	67	60	90	85	87	30
12 „	68	53	76	68	78	50	85	60	80	20
24 „	32	60	65	65	90	52	82	62	75	27
30 „	38	50	70	48	88	—	—	—	—	—
36 „	40	65	35	10	50	—	—	—	—	—
Mittelw. (%)	61	74	73	64	84	69	93	84	89	54

dringt in die Zellen verhältnismäßig schnell ein, und es ist nicht ausgeschlossen, daß es schon in diesen Konzentrationen etwas synergetisch auf KNO_3 wirkt und das Eindringen befördert.

Tabelle 19.

Rotkohl. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1,0 mol; pH 6,2.

$\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ 0,7 mol; Temp. 19°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	Ca(NO ₃) ₂ 1,0 mol (Kontrv.)	do + Frukt.	do + Sacch.	do + Glukose	do + Maltose	Sr(NO ₃) ₂ 0,7 mol (Kontrv.)	do + Xylose	do + Glukose	do + Sacch.	do + Raffin.
		0,6 mol		0,2 mol			0,4 mol			
		Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten								
6 Stunden	100	100	100	100	100	98	100	100	100	100
13 „	—	—	—	—	—	75	100	87	95	100
24 „	95	100	100	100	100	48	95	60	85	97
37 „	59	75	72	70	62	47	70	40	78	83
48 „	50	70	80	60	55	50	65	25	83	82
56 „	47	48	33	52	45	—	—	—	—	—
70 „	50	25	47	60	55	0	35	0	60	73
Mittelw. (%)	67	70	74	74	69	53	77	52	83	89

Die Ergebnisse der Tab. 18 sind in zweifacher Hinsicht interessant. Die Maltose (0,1 mol) zeigt keine a. W. gegen das NH_4NO_3 , vielleicht wegen der zu kleinen Konzentration. Die mit Laktose und Glukose vorbehandelten

Schnitte zeigen eine deutliche a. W. gegen das Ammoniumnitrat. Die Vorbehandlung der Schnitte mit Strontiumnitrat zeigt die längst bekannte a. W. zweiwertiger Kationen gegen einwertige ungefähr in demselben Maße wie die mit den Zuckern. Magnesiumsulfat hat bei dieser Versuchsanordnung keine a. W. Durch den Zusatz zum Kontrollsalz kleiner Mengen von $MgSO_4$ sterben die Schnitte noch schneller als in der Kontrolllösung ab.

Nitrate der Alkalierden

Kalziumnitrat ist für das Pflanzenplasma ziemlich unschädlich, weil das Salz sehr wenig in die Zelle eindringt. Infolgedessen haben auch die Zucker keine nennenswerte a. W. (Tab. 19). Strontiumnitrat ist schon verhältnismäßig giftiger, die Xylose, Saccharose und Raffinose wirken hier deutlich antagonistisch, die Glukose hat in diesem Versuch keine a. W.

Auch bei *Rhoeo*-Schnitten wirkt das Di- und Trisaccharid, trotz der geringen Konzentration, gegen $Sr(NO_3)_2$ klar antagonistisch (Tab. 20). Das Sorbit ist dabei unwirksam, das ihm entsprechende Monosaccharid Sorbose entfaltet eine geringere a. W.

Tabelle 20.

Rhoeo discolor. $Sr(NO_3)_2$ 0,3 mol; Temp. 20°, pH 6,2.

Einwirkungszeit der Lösungen	Sr(NO ₃) ₂ 0,3 mol (Kontrollv.)	do + Sorbit	do + Sorbose	do + Saccharose	do + Raffinose
		0,2 mol		0,15 mol	
		Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten			
3 Stunden	100	100	100	100	100
11 „	97	100	98	100	100
30 „	100	100	92	100	100
100 „	25	20	65	87	67
124 „	0	20	40	60	70
144 „	0	5	7	55	52
Mittelwert (%)	54	57	67	84	81

Auch gegen das Mg-Nitrat, das sich an die Erdalkalien anschließt, haben die Zucker a. W., wobei die Monosaccharide schwächer als die Disaccharide wirken (Tab. 21).

In dieser Versuchsserie (Tab. 22) ist das Bariumnitrat (0,4 mol) mit dem Ammoniumrhodanid (0,4 mol) zu gleichen Teilen gemischt. Dieses Gemisch ist für das Pflanzenplasma sehr giftig, weil das Rhodanid synergetisch wirkt und das Bariumsalz schneller in die Zelle eindringt. Die Glukose und Saccharose wirken gegen die Salzkombination ausgesprochen antagonistisch, allerdings in hoher Konzentration.

Tabelle 21.

Rotkohl. $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 1,0 mol; Temp. 20°, pH 6,2.

Einwirkungszeit der Lösungen	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 1,0 mol (Kontrollv.)	do + Glukose	do + Xylose	do + Maltose	do + Saccharose
		Alle Zucker 0,5 mol			
		Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten			
1 Stunde	57	68	90	100	100
2 Stunden	25	35	67	70	78
3 „	10	38	73	75	65
4 „	30	37	37	58	58
8 „	30	57	52	75	67
13 „	20	57	48	48	70
23 „	0	0	0	45	17
Mittelwert (%)	25	42	52	67	65

Tabelle 22.

Rotkohl. $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ 0,4 mol + NH_4CNS 0,4 mol; Temp. 20°, pH 6,2.

Einwirkungszeit der Lösungen	$\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ + NH_4CNS (Kontrollversuch)	do + Glukose	do + Saccharose
		1,0 mol	
		Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten	
30 Minuten	90	100	100
1 Stunde	65	100	100
2 Stunden	25	98	100
2,5 „	10	92	98
3 „	0	87	90
4 „	0	83	90
Mittelwert (%)	31	93	96

Chloride

Aus der Tab. 23 ist ersichtlich, daß die Zucker auch gegen das Alkalichlorid eine a. W. aufweisen. Es sind zwei Versuchsserien mit demselben Salz und denselben Zuckern angestellt worden. Bei den Rotkohlschnitten tritt die a. W. sehr klar hervor, das Sorbit hat etwa die gleiche Wirkung wie das Di- und Trisaccharid. Bei *Rhoeo*-Schnitten verhalten sich das Sorbit und die Arabinose indifferent, trotz der zweimal größeren Konzentration im Vergleich zur Saccharose und Raffinose, die eine mittelmäßige a. W. haben.

Die Versuche mit Na- und Li-Chlorid zeigen (Tab. 24), daß die Zucker gegen diese Salze eine gut ausgesprochene a. W. zeigen, die in der Reihenfolge: Raffinose > Saccharose > Glukose > Xylose abnimmt.

Gegen NH_4 -Salze ist die a. W. der Zucker wegen der Hydrolyse dieser Salze ziemlich unbeständig, in einigen Fällen fehlt sie gänzlich. In den Ver-

Tabelle 23.

Rotkohl. KCl 0,8 mol; pH 6,2.

Rhoeo discolor. KCl 0,4 mol; Temp. 21°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	KCl 0,8 mol (Kontrv.)	do + Sorbit 0,2 mol	do + Arabin. 0,3 mol	do + Sacchar. 0,4 mol	do + Raffin. 0,3 mol	KCl 0,4 mol (Kontrv.)	do + Arabin. 0,2 mol	do + Sorbit 0,2 mol	do + Sacch. 0,1 mol	do + Raffin. 0,1 mol
	Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten									
30 Minuten	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1 Stunde	80	95	90	98	95	82	95	100	92	100
3 Stunden	60	87	80	78	95	95	95	98	100	100
9 „	75	85	98	95	75	85	98	100	98	100
20 „	40	93	95	95	85	90	85	85	97	97
35 „	70	92	55	90	82	85	87	75	90	95
48 „	23	75	45	87	80	57	47	52	70	65
56 „	25	80	42	32	85	—	—	—	—	—
70 „	20	45	52	50	50	27	0	17	45	65
Mittelw. (%)	55	83	73	81	83	78	76	78	87	90

suchen mit dem Ammoniumchlorid ist sie deutlich vorhanden (Tab. 25). Glycerin wirkt hier etwas synergetisch.

Mit Mg-Chlorid sind zwei Versuchsserien parallel angestellt worden, mit Rotkohl und *Rhoeo* (Tab. 26). Das Verhalten dieses Salzes gegen das Pflan-

Tabelle 24.

Rotkohl. NaCl 1,0 mol; pH 6,2.

LiCl 1,0 mol; Temp. 19°, pH 6,4.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	NaCl 1,0 mol (Kontrv.)	do + Xylose	do + Sacch.	do + Raffinose	LiCl 1,0 mol (Kontrollv.)	do + Glukose	do + Sacchar.
	0,6 mol				(Kontrollv.)	0,3 mol	
	Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten						
5 Stunden	100	100	100	100	100	100	100
15 „	42	90	95	97	70	85	93
23 „	22	60	75	76	60	80	90
32 „	10	43	70	85	30	80	95
44 „	0	17	77	90	20	78	75
54 „	0	0	80	90	10	67	70
69 „	0	0	65	75	0	70	65
Mittelw. (%)	25	44	80	88	41	80	84

zenplasma ist dem der Alkalichloride ähnlich, und die Versuche dauern verhältnismäßig lange. Beim Rotkohl wirkt die Saccharose in beiden Fällen (0,2 und 0,6 mol) gegen das MgCl_2 antagonistisch, während die Glukose nur in der stärkeren Konzentration (0,6 mol) a. W. zeigt.

Tabelle 25.

Rotkohl. NH_4Cl 1,0 mol; Temp. 19°, pH 6,1.

Einwirkungszeit der Lösungen	NH_4Cl 1,0 mol (Kontrollv.)	do + Fructose	do + Sorbit	do + Saccharose	do + Glycerin
		0,3 mol			
		Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten			
5 Stunden	100	100	100	100	100
10 "	95	100	100	100	90
15 "	67	95	82	95	60
24 "	48	86	55	57	28
30 "	12	82	20	26	5
Mittelwert (%)	64	93	71	76	57

Tabelle 26.

Rotkohl. MgCl_2 1,0 mol; pH 6,2.*Rhoeo discolor*. MgCl_2 0,3 mol; Temp. 20°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	MgCl ₂ 1,0 mol (Kontrv.)	do + Gluk. 0,2 mol	do + Gluk. 0,6 mol	do + Sacch. 0,2 mol	do + Sacch. 0,6 mol	MgCl ₂ 0,3 mol (Kontr.)	do + Erythrit	do + Sorbit	do + Sacch.	do + Raff.
	0,2 mol									
	Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten									
3 Stunden	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
9 „	87	97	98	97	100	95	100	100	100	100
20 „	60	80	95	73	100	—	—	—	—	—
24 „	60	63	65	48	100	78	90	80	78	90
40 „	40	40	50	43	72	—	—	—	—	—
44 „	25	25	38	42	90	60	80	72	85	82
50 „	20	17	30	57	90	37	72	75	80	85
64 „	—	—	—	—	—	5	50	43	32	35
Mittelw. (%)	56	60	68	66	93	62	82	78	79	82

Tabelle 27.

Rotkohl. BaCl_2 0,8 mol; Temp. 20°, pH 6,4.

Einwirkungszeit der Lösungen	BaCl_2 0,8 mol (Kontrollv.)	do + Arabinose	do + Glukose	do + Saccharose	do + Maltose
		Alle Zucker 1,0 mol			
		Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten			
5 Stunden	100	100	100	100	100
8 "	82	100	95	95	100
19 "	52	65	67	57	73
22 "	32	72	75	85	95
46 "	0	0	7	90	82
Mittelwert (%)	53	67	69	85	90

Gegen das Ba-Chlorid haben die Zucker eine a. W. wie folgt (Tab. 27): Maltose > Saccharose > Glukose, Arabinose.

Wie schon oben die Versuche mit KNO_3 + Glycerin zeigten (Tab. 17), hat Glycerin gegen einwertige Neutralsalze keine a. W. In den vorliegenden

Tabelle 28.

Rotkohl. MgCl_2 0,9 mol; Temp. 19°, pH 6,2.

Einwirkungszeit der Lösungen	MgCl_2 0,9 mol (Kontrollv.)	do + Glycerin			
		0,5 mol	1,0 mol	1,5 mol	2,0 mol
		Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten			
3 Stunden	100	100	100	100	100
8 "	100	100	98	97	100
14 "	98	97	100	100	95
24 "	98	95	93	92	90
37 "	97	93	92	72	80
49 "	45	40	40	30	30
61 "	37	30	33	17	15
Mittelwert (%)	82	79	79	72	73

Versuchen mit dem (zweiwertigen) MgCl_2 sind die Ergebnisse, wie aus der Tab. 27 hervorgeht, genau dieselben: die a. W. fehlt auch hier ganz, wobei 1,5–2,0 mol Glycerin in diesen Versuchen schädlich wirkt.

Acetate

Acetate sind weniger giftig für das Pflanzenplasma als Chloride (Tab. 29). Infolge der Hydrolyse haben die Acetatlösungen eine schwach

Tabelle 29.

Rotkohl. K-Acetat 1,0 mol; pH 7,2.

K-Acetat 0,95 mol; 20 Stdn. mit den Zuckern vorbehandelt; Temp. 20°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	K-Acetat 1,0 mol (Kontrv.)	do +	do +	do +	do +	K-Acetat 0,95 mol (Kontrv.)	Vorbehandelt mit			
		Xylose	Frukt.	Laktose	Sacch.		Gluk.	Frukt.	Maltose	Sacch.
		0,6 mol		0,5 mol			0,2 mol	0,1 mol		0,2 mol
	Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten									
1 Stunde	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3 Stunden	70	87	89	80	90	97	98	97	98	98
8 „	40	91	77	83	82	65	57	77	70	80
14 „	—	—	—	—	—	70	78	80	78	80
24 „	62	80	85	80	83	50	75	78	75	65
50 „	37	60	70	68	80	30	58	68	58	55
80 „	20	60	50	43	65	24	25	60	47	35
Mittelw. (%)	55	80	78	75	83	62	70	80	75	73

alkalische Reaktion, die sich durch den Anthocyanumschlag ins Blaue erkennbar macht. Die schwach alkalische Reaktion der Acetatlösungen gibt bekanntlich dem Pflanzenplasma eine etwas größere Resistenz gegen die

Tabelle 30.

Rhoeo discolor. K-Acetat 0,3 mol; pH 7,0. Rotkohl. Na-Acetat 0,9 mol; pH 7,2.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	K-Acetat 0,3 mol (Kontrv.)	do + Sorbit 0,1 mol	do + Frukt. 0,2 mol	do + Maltose 0,05 mol	do + Sacch. 0,1 mol	Na-Acetat 0,9 mol (Kontrv.)	do + Arabin.	do + Maltose	do + Raffin.
	Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten								
2 Stunden	100	100	100	100	100	100	100	100	100
12 "	92	97	98	100	95	97	100	100	100
24 "	80	93	92	95	92	90	98	100	97
35 "	—	—	—	—	—	42	45	63	65
48 "	42	67	57	80	57	35	40	70	73
60 "	32	52	53	50	60	30	50	27	50
Mittelw. (%)	69	84	80	85	81	66	72	77	81

schädliche Wirkung der Salzionen (vgl. Lepeschkin 1910). Alle gegen das K-Acetat verwendeten Zucker wirken mäßig antagonistisch. Die vorbehandelten Schnitte (20 Stunden in den Zuckerlösungen gelegen) haben auch dadurch eine etwas größere Resistenz gegen das K-Acetat erhalten.

Tabelle 31.

Rotkohl. Mg-Acetat 1,0 mol; Temp. 21°, pH 7,6.

Einwirkungszeit der Lösungen	Mg-Acetat 1,0 mol (Kontrollvers.)	do + Xylose	do + Glukose	do + Saccharose
		0,5 mol		
	Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten			
1 Stunde	100	100	100	100
2 Stunden	80	97	100	100
6 „	65	95	100	100
11 „	73	65	80	92
24 „	52	65	72	80
36 „	37	55	60	70
48 „	30	45	52	45
60 „	12	25	40	45
Mittelwert (%)	56	68	76	79

Bei *Rhoeo discolor* bewirken die Zucker und das Sorbit eine schwächere a. W. gegen das K-Acetat (Tab. 30). Dabei hat die Konzentration der Zucker in den Grenzen von 0,05—0,2 mol keine Bedeutung. Bei den Rotkohlschnitten (Na-Acetat) lassen sich auch kleinere Wirkungsunterschiede bei der Maltose und Raffinose erkennen.

Die a. W. der Zucker gegen das Mg-Acetat steigt nach Reihenfolge:
Xylose < Glukose < Saccharose.

Tartrat und Citrat

Gegen das untersuchte Na-Tartrat haben beim Rotkohl nur die Disaccharide (Tab. 32) eine kleine a. W. Bei den *Rhoeo*-Schnitten sind die

Tabelle 32.

Rotkohl. Na-Tartrat 0,9 mol; pH 6,8.

Rhoeo discolor. Na-Tartrat 0,5 mol;
Temp. 20°, pH 6,6.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	Na-Tartr. 0,9 mol (Kontrv.)	do + Gluk. 0,5 mol	do +	do +	do + Raff. 0,5 mol	Na-Tartr. 0,5 mol (Kontrv.)	do + Gluk.	do + Eryth.	do + Sorbit	do + Sacch.	do + Malt.
			Saccharose								
			0,5 mol	0,1 mol							
			0,4 mol								
Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten											
1 Stunde	100	100	100	100	100	95	100	100	100	98	97
4 Stunden	78	70	100	100	100	95	97	98	93	91	98
10 „	60	52	82	85	93	90	97	82	97	95	95
20 „	10	24	30	45	17	52	47	20	23	42	32
25 „	5	5	40	15	12	37	60	10	21	37	20
Mittelw. (%)	51	50	70	69	64	74	80	62	67	73	68

Zucker und Alkohole unwirksam. Auch die mit der Maltose, Laktose und Saccharose vorbehandelten Rotkohlschnitte (Tabelle nicht angegeben) zeigten keine größere Resistenz gegen das Na-Tartrat.

Tabelle 33.

Rotkohl. Na-Citrat 0,8 mol; Temp. 20°, pH 7,1.

Einwirkungszeit der Lösungen	Na-Citrat 0,8 mol (Kontrollv.)	do + Sorbit	do + Arabinose	do + Laktose	do + Maltose
		0,5 mol			
		Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten			
30 Minuten	75	80	83	90	90
1 Stunde	40	45	48	65	55
1,5 Stunden	32	52	80	78	75
2 „	25	60	63	70	45
3 „	17	50	50	42	37
4 „	10	13	33	50	60
5 „	0	27	16	48	23
Mittelwert (%)	28	46	53	63	55

Im Vergleich zum Tartrat haben die Zucker gegen das Na-Citrat eine deutlich sichtbare a. W. (Tab. 33). Sie steigt in der Reihenfolge: Sorbit < Arabinose < Maltose, Laktose.

Sulfate

In der Tab. 34 sind zwei Versuchsserien mit Na-Sulfat und *Rhoeo*-Schnitten dargestellt. Die erste Serie (Na_2SO_4 0,16 mol) zeigt, daß die Pen-

Tabelle 34.

Rhoeo discolor. Na_2SO_4 0,16 mol; pH 6,5.

Na_2SO_4 0,2 mol. Die Schnitte sind 19 Stdn. mit den Zuckern vorbehandelt.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	Na ₂ SO ₄ 0,16 mol (Kontrv.)	do + Eryth. 0,2 mol	do + Frukt. 0,1 mol	do + Sacch. 0,15 m	do + Arab. 0,2 mol	Na ₂ SO ₄ 0,2 mol (Kontrv.)	Vorbehandelt mit				
							Eryth.	Frukt.	Xylose	Sacch.	Raff.
							0,2 mol				
							Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten				
1 Stunde	100	100	100	100	100	78	100	92	97	92	100
3 Stunden	90	98	97	98	100	36	85	71	70	93	73
7 „	—	—	—	—	—	35	55	45	60	60	65
11 „	57	93	82	97	95	50	85	70	80	70	67
25 „	72	92	90	95	98	27	57	47	57	62	45
36 „	—	—	—	—	—	25	50	40	47	60	55
48 „	77	90	90	82	85	7	5	7	35	12	15
60 „	0	60	35	0	0	—	—	—	—	—	—
Mittelw. (%)	66	89	82	79	80	37	62	53	64	64	60

tose, Hexose, das Disaccharid und vierwertiger Alkohol gegen das Na-Sulfat antagonistisch wirken, und zwar in den Konzentrationen 0,1–0,2 mol annähernd gleich intensiv. Die mit den Zuckern und Erythrit vorbehan-

Tabelle 35.

Rotkohl. K_2SO_4 0,5 mol; pH 6,5.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,9 mol; Temp. 19°, pH 6,4. Die Schnitte sind mit den Zuckern 19 Stdn. vorbehandelt.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	K ₂ SO ₄ 0,5 mol (Kontrv.)	do + Arab. 0,5 mol	do + Frukt. 0,6 mol	do + Sacch. 0,1 mol	do + Lakt. 0,6 mol	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0,9 mol (Kontrv.)	Vorbehandelt mit				
							Sorb.	Frukt.	Sacch.	Malt.	Raff.
							0,6 mol				
Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten											
1 Stunde	60	80	90	60	85	100	100	100	100	100	100
2 Stunden	48	70	65	53	65	90	95	80	100	100	100
3 „	57	90	63	62	85	82	87	75	95	98	100
8 „	35	48	38	52	47	73	82	62	70	90	98
12 „	35	67	57	33	48	80	85	80	65	78	75
23 „	18	60	50	17	60	47	20	16	35	10	67
30 „	17	20	30	31	45	—	—	—	—	—	—
48 „	0	30	5	0	50	27	5	35	15	8	25
Mittelw. (%)	33	58	50	38	61	71	68	64	68	69	81

delten Schnitte (Tab. 34) zeigen eine gut bemerkbare Resistenz gegen Na_2SO_4 .

Bei den Rotkohlschnitten ist die a. W. gegen das K-Sulfat nicht ganz

einheitlich (Tab. 35). Während alle Zucker eine übliche a. W. aufzeigen, macht die Saccharose, wegen der zu niedrigen Konzentration, eine Ausnahme, sie bleibt hier fast wirkungslos. Auch die mit den Zuckern vorbehandelten Schnitte haben gegen das Ammoniumsulfat keine größere Resistenz, außer den mit Raffinose behandelten.

Tabelle 36.

Rotkohl. Glycerin 25%; Temp. 20°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	in Stunden						Mittelw. (%)
	2,5	7	10	20	25	44	
	Prozentsatz der lebenden Zellen in 10 Schnitten						
Glycerin 25%	100	75	78	40	30	10	55
do + Sacch. 0,2m	100	95	95	70	55	40	70

Glycerin dringt in die Zelle leicht ein, und wie die Tab. 36 zeigt, ist eine größere Konzentration (25%) des Glycerins für die Pflanzenzellen schädlich, sie sterben binnen 48 Stunden ab. Ein kleiner Zusatz von Saccharose gibt den Zellen eine größere Resistenz gegen Glycerin.

Besprechung der Ergebnisse

Wie zahlreiche Untersuchungen der letzten 50 Jahre seit den grundlegenden Forschungen Fr. Hofmeisters über die Wirkung der Neutralsalze auf verschiedene lyophile Kolloide gezeigt haben, werden Pflanzen- und Tierzellen durch stärkere Lösungen von Neutralsalzen in mehr oder weniger kurzer Zeit getötet. Dabei werden Plasmakolloide irreversibel koaguliert, ihre elektrische Ladung nimmt ab. Es hat sich gezeigt, daß die Koagulation der Zellkolloide durch Neutralsalze nach den bekannten lyotropen Anionen- und Kationenreihen vor sich geht (vgl. die übersichtliche Zusammenfassung bei Höber 1924) und folgende Reihenfolgen von Bedeutung sind: $\text{CNS} > \text{J} > \text{Br} > \text{NO}_3 > \text{Cl} > \text{Tartrate} > \text{SO}_4$ und $\text{K} > \text{Na} > \text{Li} > \text{Mg} > \text{Ba} > \text{Ca}$ (Kahle 1923). Sie zeigen, daß die Plasmakoagulation durch Neutralsalze ein additiver Vorgang ist, was auch in erster Linie bei toten lyophilen Kolloiden zutrifft. Da die Plasmakolloide vorwiegend eine negative Ladung besitzen, so müßten diese Ionenreihen, wie dieses bei allen lyophilen Kolloiden der Fall ist, etwa eine entgegengesetzte Richtung haben, wobei die größte Fällungskraft die Sulfate, Tartrate und andere zeigen. Rhodanide, die bei der Koagulation der Plasmakolloide an erster Stelle stehen, haben bekanntlich bei negativen lyophilen Kolloiden überhaupt keine Fällungskraft, so auch Jodide und Bromide. Es ist also beim Pflanzenplasma bei Neutralsalzwirkungen im Vergleich zu toten Kolloiden alles umgekehrt. Dieses weist darauf hin, daß bei Neutralsalzwirkungen die Koagulation der Plasmakolloide durch diese Salze kein primärer Vorgang ist, sondern von einem anderen Prozeß unmittelbar abhängt. Um auf das Plasma wirken zu können, müssen die Salze erst in das Plasma ein-

dringen. Ich habe in einer eingehenden Untersuchung gezeigt (K a h o 1923), daß es hier in erster Linie auf die Permeabilität des Plasmas für Neutralsalze ankommt. Beim Pflanzenplasma stehen die Permeabilitätsverhältnisse in direktem Zusammenhang mit dem Hydratationsvermögen der Salze. Salze, die das Plasma stark zu hydratisieren vermögen, dringen auch ins Plasma schnell ein. Die oben angeführten lyotropen Ionenreihen stellen die Hydratations- und gleichzeitig auch die Permeabilitätsreihen für Salze dar. Diese Feststellung haben wir experimentell beweisen können (K a h o, l. c.). Je mehr und je schneller sich ein Neutralsalz im Plasma ansammelt, desto schneller desorganisiert es die lebende Substanz, desto „giftiger“ ist es. Beim Eindringen ist das Hydratationsvermögen der Neutralsalze maßgebend, während die sogenannte Giftigkeit der Salze nur als Folge dieser primären Wirkung anzusehen ist. Die ersten Glieder der lyotropen Anionenreihe (Rhodanide, Jodide, Bromide) der Kalium-, Natrium- und Lithiumsalze dringen schnell in die Zelle ein, sind infolgedessen auch sehr giftig und töten das Plasma schnell ab. Dagegen dringen z. B. Alkalierden sehr langsam ein und sind weniger giftig. Alle Faktoren, die die Permeabilität der Zellen für Salze erhöhen, wie z. B. eine verhältnismäßig höhere Temperatur, beschleunigen auch das Absterben der Zellen in geeigneten Salzlösungen (K a h o 1926). So sterben die Schnitte bei 25° etwa zehnmal schneller als bei 5° ab.

Dagegen wirken die Permeabilität herabsetzende Faktoren antagonistisch gegen die schädliche Wirkung der Neutralsalze. In Versuchen habe ich gezeigt (K a h o 1923), daß, wenn man kleine Mengen eines dehydratisierenden Salzes (Erdalkalien) zum schnell eindringenden Salz zusetzt, die Eindringungsgeschwindigkeit stark herabgesetzt wird, das Plasma bis zu einem gewissen Grade dehydratisiert und dichter wird, das Salz nicht so schnell und nicht in großen Mengen durchläßt. Das zugesetzte Salz hat eine „antagonistische Wirkung“, und die Kombination zweier Salze wirkt nicht mehr so schädlich wie das schnell eindringende Salz allein.

Setzt man zu den schnell eindringenden Neutralsalzen kleine Mengen eines Mono- oder Disaccharids zu, so wird die Giftigkeit der Salze herabgesetzt. Die Zucker wirken hier antagonistisch gegen die Salze. Diese Tatsache läßt sich mit einem einfachen Versuch makroskopisch demonstrieren. Der Austritt des Farbstoffes aus den anthocyanhaltigen Zellen gilt immer als sicheres Merkmal, daß die Zellen tödlich beschädigt oder abgestorben sind. Anthocyan ist in den Zellen hochkolloidal gelöst und diffundiert nur aus toten bzw. aus den Zellen heraus, die schon im Absterben sind.

Fünf größere Probiergläser oder kleinere Deckeldosen werden mit 20–25 cm³ KCNS 1 n-Lösung so gefüllt, daß alle Gefäße die gleiche Menge enthalten. In vier Gefäße fügt man noch Saccharose in substantia hinzu, so daß man im ersten eine 20%ige Lösung, im zweiten eine 15%ige, im dritten eine 10%ige und im vierten eine 5%ige Lösung erhält. Das fünfte Glas bleibt als Kontrollglas ohne Zucker. In alle Gläser legt man dann etwa die gleiche Menge kleingeschnittener und gut gewaschener (etwa 3–4mal) Stücke eines Rotkohlblattes. Nach 10–30 Min. sieht man, daß im Kontrollgefäß die Flüssigkeit (etwas schütteln!) schön violett gefärbt, in den anderen Gefäßen, je nach der Zuckermenge, von schwachviolett bis farblos

erscheint. Die mikroskopische Kontrolle zeigt, daß in Zuckerlösungen die Zellen zum größten Teil (je nach dem Zuckergehalt) am Leben sind und in Wasser gut deplasmolysieren und noch einmal plasmolysieren, während im Kontrollversuch fast alle Zellen abgestorben sind.

Bevor wir auf die a. W. der Zucker und polyvalenten Alkohole (Antagonistika) näher eingehen, vergleichen wir nun die Wirkung der einzelnen Antagonistika unter sich. In vielen Fällen ist die a. W. aller hier verwendeten organischen Verbindungen ziemlich gleich und im allgemeinen ist die Wirkung großen Schwankungen unterworfen. Im allgemeinen könnte man vielleicht annehmen, daß die a. W. gegen Salze von der Zahl der lipophoben OH-Gruppen in den Molekülen abhängig ist, und zwar so, daß die a. W. mit der Vergrößerung der Zahl dieser Gruppen in den Antagonistika zunimmt. Aus diesem Grunde ist es verständlich, daß Monosaccharide im allgemeinen schwächer wirken als Disaccharide, am besten jedoch das Trisaccharid Raffinose. Die a. W. der sechswertigen Alkohole Mannit und Sorbit kommt etwa der der Hexosen gleich, obwohl dieses nicht immer zutrifft. Man kann eine folgende Reihe für die a. W. der Zucker und Alkohole aufstellen: Erythrit < Arabinose, Xylose < Glukose, Mannose, Fruktose, Sorbose, Galaktose, Sorbit, Mannit < Saccharose, Maltose, Laktose < Raffinose. Doch kommen ab und zu Fälle vor, in welchen fast das Umgekehrte zutrifft, wie dieses auch aus den Tabellen ersichtlich ist. So kann unter Umständen eine Pentose oder Hexose besser antagonistisch wirken als ein Disaccharid. Bei der a. W. der Zucker gegen Säuren und Laugen (über die an einer anderen Stelle berichtet wird) tritt die Abhängigkeit der a. W. von der Zahl der OH-Gruppen deutlicher hervor.

Feinere Differenzen der a. W. lassen sich mit der hier angewandten Methode nicht feststellen, und es ist wahrscheinlich, daß biologische Methoden zu diesem Zweck nicht ausreichen. Ich habe den Eindruck gewonnen, daß die Isomerie bei den Hexosen hier keine Rolle spielt; auch ich habe keine konstanten Wirkungsdifferenzen zwischen Keto- und Aldoformen der Monosen beobachtet.

Alle einwertigen Alkohole dringen sehr schnell in die Zellen ein (E. Overton) und wirken bekanntlich tödlich; sie töten das Pflanzenplasma in kurzer Zeit ab. Für die Rotkohlzellen ist die letale Konzentration des Äthylalkohols ca. 10–20%; sie tötet die Zellen in 30–60 Minuten ab. Das Zufügen kleiner Mengen der Zucker oder polyvalenter Alkohole oder auch von Neutralsalzen (NaCl , Na_2SO_4 , $\text{Ca}[\text{NO}_3]_2$ und anderen) wirkt synergetisch und vergrößert die Giftigkeit des Alkohols.

Äthylen-Glykol (zwei OH-Gruppen) ist für das Pflanzenplasma schon bedeutend weniger giftig. Es dringt nach E. Overton langsamer ein und plasmolysiert die Zellen vorübergehend. Seine letale Konzentration beträgt für Rotkohlzellen ca. 25–30%; sie sterben in 5–10 Stunden ab. Mono- und Disaccharide wirken gegen diesen Alkohol schon deutlich antagonistisch. Glycerin (drei OH-Gruppen), das bekanntlich noch langsamer eindringt, hat für die obengenannten Zellen eine letale Konzentration von 25–50%; die Zellen sterben in 25–40 Stunden ab.

Äthylen-Glykol und Glycerin wirken auch noch synergetisch. Erythrit

(vier OH-Gruppen) ist für das Pflanzenplasma fast unschädlich; es besitzt auch keine nennenswerte Eindringungsfähigkeit. Es ist interessant zu bemerken, daß die a. W. schon bei Erythrit sehr deutlich zum Vorschein kommt, in gleicher Weise bei den Pentosen Arabinose und Xylose. Alle untersuchten Hexosen — Glukose, Mannose, Galaktose, Fruktose, Sorbose — ungeachtet dessen, ob sie Aldosen oder Ketosen sind, wirken ungefähr gleich antagonistisch, ebenso die polyvalenten Alkohole Sorbit und Mannit, die sich ihrer Wirkung nach den Hexosen anschließen. Darüber hinaus wirken die Disaccharide — Saccharose, Maltose, Laktose — etwas stärker antagonistisch, der größeren Zahl der OH-Gruppen entsprechend. Das Trisaccharid Raffinose (Melitose) hat in einigen Fällen eine deutlich stärkere a. W. gegen Salze als die Disaccharide.

Was die Konzentration der Zucker und Alkohole bei der a. W. betrifft, so liegt die untere Grenze etwa bei 0,1 mol; in einigen Fällen ist aber schon bei 0,05 mol eine schwache Wirkung zu bemerken. Im allgemeinen steigt sie mit der Erhöhung der Konzentration bis zu einer gewissen Grenze. Beim Rotkohl, der ein äußerst resistentes Objekt darstellt, kann man die Konzentration bis 1 mol erhöhen, ohne daß dabei für das Versuchsobjekt irgendwelche schädliche Folgen sichtbar werden. Es ist schon seit längerer Zeit bekannt, daß eine wiederholte Plasmolyse und Deplasmolyse die Pflanzenzellen schnell zum Tode führen. So z. B. die zarten Zellen von *Spirogyra* sterben nach einer stärkeren Plasmolyse bald ab. Die Epidermiszellen von *Rhoeo discolor* sind schon bedeutend widerstandsfähiger. Die Oberhautzellen von Rotkohl lassen sich in der Saccharoselösung (1 mol) ohne sichtbare Schäden für die Zellen mehrmals plasmolysieren und in Leitungswasser deplasmolysieren. Aus diesem Grunde kann man bei Rotkohl nach Bedarf auch starke Lösungen (bis 1 mol) der Antagonistika verwenden. Bei *Rhoeo*-Zellen schwankt die Konzentration in der Nähe der plasmolytischen Grenzkonzentration (ca. 0,2 mol Saccharose).

Es erhebt sich nun die Frage: Was ist die Ursache der a. W. der Zucker und hochwertigen Alkohole? Wir haben hier eine analoge Erscheinung, wie sie bei den anorganischen Salzen stattfindet, und zwar, daß die Antagonistika den Eintritt des schädlichen Salzes in die Zelle verhindern, indem sie die Permeabilität des Plasmas für diese Salze bis zu einem gewissen Grade herabsetzen. Ein Neutralsalz kann nur dann für das Plasma schädlich sein, wenn es in größerer Menge durch das Plasma eindringt, wobei das Plasma zur irreversiblen Koagulation gebracht wird. Wird aber das Salz am Eintritt verhindert, so kann es auch nicht schädlich wirken. Da in den Mischungen Salz + Zucker das Eindringen der Salze nicht hundertprozentig herabgesetzt wird, so sammeln sie sich allmählich im Plasma an und töten die Zelle ab. Die Zucker und höheren Alkohole verlangsamen den Eintritt der Salze in die Zelle, für jedes Salz und jede Konzentration in verschiedener Weise. Versuche, die gleichzeitig mit den Zuckern und Erdalkalien als Antagonistika angestellt wurden, zeigen eine völlige Übereinstimmung (vgl. auch Tab. 18, die Vorbehandlung der Schnitte mit $\text{Sr}[\text{NO}_3]_2$).

Um die Verminderung der Permeabilität der Zelle für Salze durch die Antagonistika zu beweisen, habe ich einige Permeabilitätsversuche angestellt.

Permeabilitätsversuche

Die Versuche wurden mit Flächenschnitten von *Rhoeo discolor* ausgeführt. Beim Blatt wurde die Mittelrippe der Unterseite der Länge nach halbiert, und da immer je zwei Schnitte verglichen wurden, so wurden sie aus den gegenüberliegenden Teilen der Mittelrippe hergestellt. Es wurde in den fein abgestuften Salzlösungen (0,0025 mol) die Verschiebung der plasmolytischen Grenzkonzentration beobachtet. Zu Beginn eines jeden Versuches wurde auch die plasmolytische Grenzkonzentration in den Saccharoselösungen ermittelt. In jedem Versuch kamen parallel zwei Reihen der abgestuften Salzlösungen zur Untersuchung. Die erste Reihe enthielt als Kontrolle reines Salz, die zweite zusätzlich noch eine kleine Menge eines Zuckers oder mehrwertigen Alkohols, in der Weise, daß die Lösungen der beiden Reihen streng isotonisch waren. Darüber hinaus wurden auch Versuche angestellt, bei denen die Schnitte der zweiten Reihe mit den Zuckerlösungen vorbehandelt waren.

Um einen vergleichbaren zahlenmäßigen Ausdruck für die Permeierbarkeit (P) der Salze zu erhalten, wurde die Permeierbarkeit $P = \frac{K_1}{K_2}$ gesetzt, wobei K_1 die plasmolytische Grenzkonzentration in der Salzlösung in den aufeinanderfolgenden Zeitpunkten ist, K_2 die mit Saccharose ermittelte Grenzkonzentration zu Beginn des Versuches (vgl. auch Collander u. Bärlund 1926). (Das Eindringen der Saccharose ist praktisch Null.)

Zu den Permeabilitätsversuchen eignen sich nur schnell eindringende Neutralsalze, wie Alkali Rhodanide, Bromide, in einigen Fällen auch Nitrate und Chloride. Die letzteren zwei Salzgruppen sind aber zu diesem Zweck weniger gut. Die übrigen Salze, wie die Alkali Acetate, Tartrate, Citrate, Sulfate und andere, dringen sehr langsam ein (vgl. Fitting 1915) und sind aus diesem Grunde unbrauchbar.

Aus dem Obengesagten ist ersichtlich, daß die P -Werte ein gewisses Maß für die Permeabilität des Plasmas in bezug auf die Salze darstellen und parallel mit der Zunahme der Permeabilität ansteigen. Um in der Tabelle ganze Zahlen zu erhalten, sind die P -Werte mit 10^2 multipliziert.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse der Permeabilitätsversuche zeigt, daß alle Zucker und mehrwertigen Alkohole das Eindringen der Neutralsalze in die Pflanzenzelle bis zu einem gewissen Grade hemmen und infolgedessen antagonistisch wirken, außer Glycerin, das das Eindringen der Salze etwas fördert.

Die Unterschiede in den P -Werten der Kontroll- und Zuckerversuche sind nicht groß, was auf eine mehr oder weniger normale Permeabilität hinweist. Was die Beeinflussung der Permeabilität durch die einzelnen Zuckergruppen betrifft, so ist es schwierig, auf Grund der vorliegenden Versuche mit Sicherheit zu sagen, welche Zucker — Pentosen, Hexosen oder Disaccharide — das Eindringungsvermögen der Salze am stärksten hemmen, da hier

Tabelle 37.
Pentosen.

Temp. 20–22°.

	P. 10 ³ nach						
	1 Std.	2 Stdn.	3 Stdn.	4 Stdn.	5 Stdn.	6 Stdn.	7 Stdn.
Saccharosewert ¹ — 0,25 mol							
1. NaCNS (Kontrollvers.)	62	64	66	—	68	—	70
10 cm ³ NaCNS + 3 cm ³ isoton. Xylose	61	63	65	—	67	—	68
Differenz in mol.	0,0025	0,0025	0,0025	—	0,0025	—	0,0075
Saccharosewert — 0,254 mol							
2. NaCNS (Kontrollvers.)	63	64	67	70	—	75	—
10 cm ³ NaCNS + 1,75 cm ³ isoton. Arab.	61	62	64	65	—	69	—
Differenz in mol.	0,005	0,005	0,0075	0,0125	—	0,015	—

Hexosen.

	P. 10 ³ nach						
	1 Std.	2 Stdn.	3 Stdn.	4 Stdn.	5 Stdn.	6 Stdn.	7 Stdn.
Saccharosewert — 0,23 mol							
1. KBr (Kontrollvers.)	64	—	66	—	69,5	—	72
9 cm ³ KBr + 1 cm ³ isoton. Fruktose	62	—	63	—	65	—	69
Differenz in mol.	0,005	—	0,0075	—	0,0075	—	0,005
Saccharosewert — 0,258 mol							
2. NaCNS (Kontrollvers.)	64	66	70	73,6	—	—	—
8 cm ³ NaCNS + 2 cm ³ isoton. Glukose	62	64	65	66,8	—	—	—
Differenz in mol.	0,005	0,005	0,01	0,0175	—	—	—
Saccharosewert — 0,204 mol							
3. NaCNS (Kontrollvers.)	77	80	82,5	—	85	87	—
7,5 cm ³ NaCNS + 2,5 cm ³ isoton. Mann.	76	77	78	—	80,9	82	—
Differenz in mol.	0,0025	0,0075	0,01	—	0,01	0,01	—

Disaccharide, Raffinose, Sorbit und Glycerin.

	P. 10 ³ nach						
	1 Std.	2 Stdn.	3 Stdn.	4 Stdn.	5 Stdn.	6 Stdn.	7 Stdn.
Saccharosewert — 0,275 mol							
1. NaCNS (Kontrollvers.)	62	63	66	68	69	71	
10 cm ³ NaCNS + 4 cm ³ isoton. Sacch.	61	61,5	63	65	66	67	
Differenz in mol.	0,0025	0,0025	0,0075	0,005	0,05	0,01	
Saccharosewert — 0,217 mol							
2. NaCNS (Kontrollvers.)	63	68	72	—	—	—	
9 cm ³ NaCNS + 1 cm ³ isoton. Laktose	60	64	65,5	—	—	—	
Differenz in mol.	0,0075	0,0075	0,0125	—	—	—	
Saccharosewert — 0,247 mol							
3. NaCNS (Kontrollvers.)	62	65	66	—	—	—	
7,5 cm ³ NaCNS + 2,5 cm ³ isoton. Malt.	60	62	63	—	—	—	
Differenz in mol.	0,005	0,0075	0,0075	—	—	—	
Saccharosewert — 0,22 mol							
4. KBr (Kontrollvers.)	63	66	67	—	73	—	
8 cm ³ KBr + 2 cm ³ isoton. Raffinose	61	62,5	63,5	—	68	—	
Differenz in mol.	0,0025	0,0075	0,0075	—	0,01	—	
Saccharosewert — 0,221 mol							
5. NaCNS (Kontrollvers.)	63,4	66	69	72	—	—	
10 cm ³ NaCNS + 3 cm ³ isoton. Sorbit	62	64	66	67,7	—	—	
Differenz in mol.	0,0025	0,01	0,01	0,015	—	—	
Saccharosewert — 0,18 mol							
6. KNO ₃ (Kontrollvers.)	60	64	69	—	—	—	
10 cm ³ KNO ₃ + 5 cm ³ isoton. Glycerin	63	67	72	—	—	—	
Differenz in mol.	0,0075	0,005	0,0075	—	—	—	

¹ Saccharosewert bedeutet die plasmolytische Grenzkonzentration der Saccharoselösung zu Beginn des Versuches.

oft große Schwankungen stattfinden und auch die Zahl der Versuche (die übrigens sehr schwierig durchzuführen bzw. zeitraubend sind) sehr klein ist. Nehmen wir den Durchschnitt der Unterschiede der *P*-Werte der ersten drei Stunden, so sehen wir folgendes:

Durchschnitt der Unterschiede bei $P \cdot 10^2$ -Werten.

Stunden →	1	2	3
Pentosen	1,5	1,5	2,5
Hexosen	1,7	2,5	3,8
Disaccharide und Raffinose ¹	2,0	3,5	3,5

¹ Siehe auch Tab. 38.

Betrachten wir die Zahlen bei den einzelnen Zuckergruppen, so können wir sagen, daß die einzelnen Zuckergruppen die Permeabilität wie folgt hemmen: Pentosen < Hexosen < Disaccharide < Raffinose.

Dieses Resultat könnte vielleicht auch im allgemeinen zutreffen. Daß es sich aber so klar aus den vorliegenden Versuchen ergibt, dürfte wohl z. T. zufällig sein, denn die einzelnen Versuche sind, streng genommen, nicht ganz exakt vergleichbar, da das Versuchsmaterial von verschiedenen Pflanzen stammt und auch die Temperatur bei der Ausführung der Versuche innerhalb 20° schwankte. Ferner, wie schon oben erwähnt, weisen die Versuche große Schwankungen auf. Eine bewiesene Tatsache bleibt jedoch die, daß die Zucker bei Pflanzenzellen die Permeabilität für Neutralsalze herabzusetzen vermögen. Diese Eigenschaft steht in irgendeiner Weise in kausalem Zusammenhang mit den OH-Gruppen der Zucker. Aus diesem Grunde müßten Disaccharide das Eindringen der Salze stärker hemmen als Monosaccharide, desgleichen Hexosen stärker als Pentosen.

In meinen Untersuchungen über die a. W. der Zucker gegen Salze, die erstmalig durchgeführt worden sind, ging ich von der bekannten Tatsache aus, daß bei den Pflanzenzellen die Plasmolyse bis zum Zustandekommen des plasmolytischen Gleichgewichts in Saccharoselösungen viel mehr Zeit beansprucht als in Neutralsalzlösungen. Darauf wurde schon von H. de Vries in seiner bekannten Arbeit über die isotonischen Koeffizienten hingewiesen. Eine kugelförmige Abrundung des Protoplasten und Ablösung von der Zellwand in einer hypertonischen Rohrzuckerlösung bei *Rhoeo* braucht zwei oder sogar mehr Stunden, während dieselbe Form der Plasmolyse in KNO_3 - bzw. $KCNS$ -Lösungen nach wenigen Minuten erreicht wird.

In Rohrzuckerlösungen wird die Oberfläche des Protoplasten verdichtet, und infolgedessen löst sich die an die Zellwand (teilweise auch in die poröse Wand) gepreßte Plasmaoberflächenschicht nicht so leicht von ihr ab. Dabei wird auch durch diese Verdichtung die Permeabilität für Salze herabgesetzt. In der botanischen Literatur haben wir hierüber keine direkten Angaben. Es sei hier auf die Beobachtungen von E. Küster (1910) hingewiesen, wonach bei den in Rohrzucker- oder Calciumnitratlösung plasmolysierten

Teilstücken der Protoplasten von *Allium cepa* das Fusionsvermögen bei der Deplasmolyse verlorengelht. Rohrzucker sistiert die Zusammenschmelzung leichter als $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ und verfestigt scheinbar die Oberfläche besonders deutlich.

In meinen Versuchen zeigten Erdalkalien etwa dieselbe a. W. wie Disaccharide. Bezüglich der Verdichtung (Agglutination) der Plasmaoberfläche durch Rohrzucker äußert sich H ö b e r (1924) wie folgt:

„Die Agglutination in Rohrzucker- und anderen Nichtleiterlösungen ... beruht zum Teil auf der Änderung der elektrischen Ladung, aber wohl mehr auf der Aufprägung eines mehr suspensionskolloiden Charakters, die mit einer Verdichtung oder Gelatinierung des Protoplasten einhergeht ... So bildet Waschen der Blutkörperchen in Rohrzuckerlösung ein Mittel, um ihre Resistenz gegen Narkotika und Saponin zu erhöhen. Ein Analogon dazu ist wohl die von K ü s t e r bemerkte eigentümliche ‚Verhärtung‘ der pflanzlichen Plasmahaut durch Rohrzucker ... Diese Verhärtung wird wiederum, wie sich gut denken läßt, eine Verminderung der Permeabilität zur Folge haben können ... So verläuft nach H. R h o d e die hämolytische Wirkung von Ammon- und Alkaloidsalzen, die nach G r i j n s und H e d i n auf ihrer Fähigkeit beruht, im Gegensatz zu anderen Salzen in die Blutkörperchen einzudringen, nach Rohrzuckerwaschung erheblich langsamer als nach Kochsalzwaschung. Ein noch klarerer Hinweis auf eine Abdichtung

Tabelle 38.

Schnitte mit Raffinose 0,18 mol 20 Std. vorbehandelt; Temp. 20°.

Saccharosewert 0,18	P. 10 ₃ nach			
	1 Stunde	3 Stunden	5 Stunden	6 Stunden
KCNS (Kontrollvers.)	65,3	66,6	75	77
KCNS, Schnitte mit Raff. vorbeh.	62,5	64	66	71
Differenz in mol	0,005	0,005	0,015	0,05

der Oberfläche ist anscheinend die Feststellung von M e m m e s h e i m e r und mir, daß der Übertritt von Farbbasen, wie Rhodamin B oder Methylviolett, die mit Leichtigkeit in die Blutkörperchen eindringen, durch Waschung mit isotonischer Rohrzucker- oder Glykokoll-Lösung erheblich verzögert werden kann ...“

Die vorliegenden Versuche mit der Vorbehandlung der Schnitte mit verschiedenen Zuckerlösungen (Tab. 13, 14, 18, 29 u. a.) sind der oben zitierten Waschung der Blutkörperchen mit Rohrzuckerlösung sehr ähnlich. Bei der Vorbehandlung werden die Schnitte eine Zeitlang in Mono- oder Disaccharid- resp. Raffinoselösung gehalten und dann die schädliche Salzwirkung mit den nicht vorbehandelten Schnitten parallel beobachtet. Die vorbehandelten Schnitte zeigen immer eine größere Resistenz gegen die Neutralsalze, da Zuckerlösungen die Permeabilität für Salze herabsetzen. Dieses ist auch aus der Tab. 38 ersichtlich. Die Versuche werden hier in gleicher Weise wie in der Tab. 37 angestellt.

Die in der Tab. 38 dargestellten Versuche bestätigen in bester Weise die These, daß eine Vorbehandlung der Schnitte mit Zucker die Permeabilität des Plasmas für Salze vermindert. Salze werden am Eindringen verhindert und sind infolgedessen für Plasma weniger schädlich. Ähnlich wirkt auch die Vorbehandlung mit $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ (Tab. 18).

Es entsteht nun die Frage: Welche Stoffe des Pflanzenplasmas kommen vom chemischen Standpunkt für die „Verfestigung“ der Oberfläche in Betracht? Ich werde von den verschiedenen neueren Ansichten über die Struktur des Protoplasmas Abstand nehmen und verweise an dieser Stelle auf die ausgezeichnete und klare Übersicht bei Höber (1947). Es sei hier nur kurz gesagt, daß nach Höber (l. c.) das einzige Material, das für chemische Analysen in ausreichenden Mengen zur Verfügung steht, aus den Stromata oder „Schatten“ der roten Blutkörperchen besteht, wobei diese zum Teil Stücke der Plasmamembran, zum Teil Überreste eines Gerüsts, das das Zellinnere ausfüllt, sind. Diese Haupt-Bausteine dieser Struktur sind Lipide und Eiweiße, durchschnittlich im Verhältnis 1:1,7. Unter den Lipiden überwiegen Phosphatide (l. c.).

Meines Erachtens haben die Befunde von Hansteen-Cranner (1922) in der Zellphysiologie viel zu wenig Beachtung gefunden. Er stellte auf Grund einer großen Anzahl von Versuchen die sehr wichtige Tatsache fest, daß Pflanzengewebe oder intakte Organe, ja sogar ganze Pflanzen in unbeschädigtem Zustande bei normalen Temperaturen an das Außenmedium (Wasser) verschiedene Phosphatide intensiv abgeben. Bei 20–25° treten ins Wasser nur wasserlösliche, bei ca. 30° auch wasserunlösliche Phosphatide heraus². Über diese Phosphatide sagt Hansteen-Cranner (l. c.), daß sie sich an der Oberfläche des Plasmas sammeln und so die peripheren und für den Stoffaustausch verantwortlichen Grenzsichten bilden. Auch daß sie hier als die einzigen Baubestandteile auftreten, geht seines Erachtens daraus hervor, daß in seinen zahlreichen Versuchen eiweißartige Stoffe nie gleichzeitig mit den unlöslichen Phosphatiden heraustraten.

Die Versuche von Hansteen-Cranner haben gezeigt, daß die Plasmaoberfläche von Pflanzenzellen mit Phosphatiden bedeckt ist, die teils mit dem Plasmamembran locker verbunden, teils an der Oberfläche adsorbiert sind³, wobei die Verbindung mit dem eigentlichen Plasma so locker ist, daß sie an das Außenmilieu abgegeben werden können.

Vermutlich werden die Phosphatide als Komplexverbindungen (Lipoproteide?) im Plasma produziert. Der lipoide Anteil wird unter Umständen abgespalten und wieder neu produziert. Daraus läßt sich folgern, daß durch Zucker an der Plasmaoberfläche Phosphatide verfestigt werden, denn 1. eiweißartige Stoffe hat Hansteen-Cranner an der Oberfläche nicht gefunden; 2. gegen Eiweiß sind Zucker inaktiv; 3. Erdalkalien (insbesondere Ca-Salze), die als wirksame Antagonistika gegen Alkalisalze bekannt sind, setzen in

² Diese Phosphatide hat später der bekannte Biochemiker Viktor Grafe (Wien) eingehend untersucht.

³ Mit dem Gesagten ist nicht eine Lipoidhaut gemeint.

gleicher Weise wie Zucker die Permeabilität des Plasmas für Salze herab (K a h o 1923). Sie sind gegen Eiweiß wenig aktiv. Während kleine Mengen der Erdalkalien genügen, um das Eindringen der Alkalisalze in die Zelle zu hemmen, werden Eiweißkörper nur durch konzentrierte Lösungen von Erdalkalien gefällt. Die Calciumsalze koagulieren z. B. das Alkalieweiß nur als 4—7fache Normallösungen (P a u l i und H a n d o w s k y 1910).

Ausgehend vom Standpunkt, daß Zucker und Erdalkalien die Oberflächenschicht des Plasmas verdichten, haben wir keine genügenden Beweise für die Voraussetzung, daß hier Eiweißstoffe verdichtet werden. Nach P o r g e s und N e u b a u e r (1907) fällen schon 0,01 *n* Lösungen der Chloride von Ca, Sr, Ba und Mg das Lezithin ebensogut wie die 1,0 *n* Lösungen, während die Koagulationskraft der Alkalisalze schon bei 0,2 *n* erlischt. Bei der Fällung des Eiweißes besteht kein Unterschied in den Konzentrationen der Erdalkalien und Alkalisalze. Beide Salzgruppen bedürfen zur Fällung großer Salzmengen, obwohl die durch die Erdalkalien erzeugten Niederschläge, im Gegensatz zu denjenigen der Alkalisalze, irreversibel sind. Ich habe in früheren Versuchen gefunden, daß eine kleine Menge von CaCl_2 (0,19 mol) die Aufnahme von KNO_3 in die Zelle im Laufe einer Stunde vollständig sistiert, während die äquivalenten Mengen von BaCl_2 die Salzaufnahme um ca. 70% und von MgCl_2 nur um 20% herabsetzen (K a h o 1923). Ebenso genügen kleinere Mengen von Calciumsalzen, um eine schädliche Lösung der Alkalisalze zu entgiften. Der große Unterschied zwischen den Wirkungen der Alkalisalze und Erdalkalien bei den Permeabilitätsvorgängen und Entgiftungsprozessen ist ein guter Beweis dafür, daß hier nicht die Eiweißstoffe des Plasmas den Ausschlag geben, sondern andere Stoffe, wahrscheinlich Phosphatide. Ferner sind, wie oben erwähnt, Zucker gegen Eiweiß völlig inaktiv, dagegen können die von H a n s t e e n - C r a n n e r entdeckten Zellphosphatide nach den Versuchen von V. G r a f e (Wien) durch Zucker zur Gel-Bildung gebracht werden.

Bezüglich der Verfestigung der Plasmaoberfläche in den Fusionsversuchen von E. K ü s t e r (1909) sagt H ö b e r (1947, S. 343) wie folgt: „Diese Verfestigung läßt sich mit der Förderung der Gel-Bildung und des Schrumpfens von Gelatine durch Saccharose und Glukose vergleichen, die auf ihrer Dehydrationskraft beruht.“

Würden an der Plasmaoberfläche bei der a. W. durch Zucker und Salze die Eiweißstoffe des Plasmas verdichtet werden, so bliebe es unklar, warum nur immer ausschließlich die Oberflächenschicht verdichtet werden soll und warum die Verdichtung sich nicht nach innen in tiefere Schichten des Plasmas weiterverbreiten könnte. Eine Verdichtung der inneren Schichten des Plasmas ist aber wenig wahrscheinlich, denn in diesem Fall müßten alle Lebensprozesse des Plasmas stehen bleiben.

Es spricht alles dafür, daß die Stoffe auf der Plasmaoberfläche eine einfachere Zusammensetzung als Eiweiß haben müssen und derartige wären, daß sie das Plasma mit einem kleineren Energieverlust immer wieder synthetisieren kann und daß sie sich wegen ihrer Oberflächenaktivität an der Oberfläche anzusammeln vermögen. Solche Eigenschaften besitzen die Phosphatide.

Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Es wurde die antagonistische Wirkung der Monosaccharide Arabinose, Xylose, Glukose, Fruktose, Mannose, Galaktose, Sorbose, der Disaccharide Saccharose, Maltose, Laktose, des Trisaccharids Raffinose, des Glycerins und der mehrwertigen Alkohole Erythrit, Mannit, Sorbit bei den Zellen zweier Pflanzen — Rotkohl und *Rhoeo discolor* — gegen die schädliche Wirkung (Plasmakoagulation) der einzelnen Alkalisalze und der Erdalkalien untersucht.

2. Als plasmakoagulierende Neutralsalze wurden K-, Na-, NH_4 - und Ca-Rhodanid; K-, Na-, NH_4 -, Li-, Ca-, Sr- und Mg-Nitrat; K-, Na-Jodid; K-, Na- und NH_4 -Bromid; K-, Na-, NH_4 -, Li-, Mg- und Ba-Chlorid; K-, Na- und Mg-Acetat; Na-Tartrat, Na-Citrat; K-, Na-, NH_4 - und Mg-Sulfat verwendet.

3. Die Versuche ergaben, daß die Zucker und mehrwertigen Alkohole gegen Neutralsalze antagonistisch wirken und diese Wirkung während der Versuchszeit (bis zwei Tage und länger; durchschnittliche Versuchsdauer aus 230 Versuchen 42 Stunden) der a. W. der Erdalkalien ziemlich ähnlich ist.

4. Es ist wahrscheinlich, daß die a. W. mit den OH-Gruppen der Zucker und Alkohole in irgendeinem Zusammenhang steht, wobei die a. W. mit der Vergrößerung der Zahl dieser Gruppen in den Verbindungen zunimmt. So wirken Monosaccharide im Durchschnitt etwas schwächer als Disaccharide, das Trisaccharid Raffinose wirkt stärker als diese.

Glycerin, mit 3 OH-Gruppen, dringt noch ziemlich schnell in das Plasma ein und wirkt daher in Verbindung mit Salzen energetisch: die Zellen sterben schneller ab.

Erythrit, mit 4 OH-Gruppen, hat schon eine deutlich auftretende a. W. Die höheren Homologe wirken gemäß der Zahl der OH-Gruppen ungefähr wie die ihnen entsprechenden Zucker.

5. Wie die Versuche zeigen, kommt die a. W. der Zucker und Alkohole dadurch zustande, daß sie die Permeabilität der Zellen für die Salze herabsetzen. Es dringen viel kleinere Mengen der Salze in die Zelle, wodurch auch ihre schädliche Wirkung vermindert wird.

6. Die Zucker und Alkohole bewirken eine Verfestigung der Oberflächenschicht des Plasmas, wodurch das Eindringen der Salze erschwert wird.

7. Es spricht vieles dafür, daß die Stoffe, die auf der Plasmaoberfläche durch Zucker oder Alkohole verfestigt werden, Phosphatide sind.

Der Forschungsgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft, durch deren freundliche Unterstützung die vorliegende Arbeit ermöglicht wurde, spreche ich an dieser Stelle meinen tiefempfundenen Dank aus.

Mein herzlicher Dank gebührt ferner den Professoren Prof. Dr. Fr. Overbeck, damals Direktor des Botanischen Instituts der landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Bonn (z. Z. in Kiel), Prof. Dr. W. Schumacher, Direktor des Botanischen Instituts der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bonn, Prof. Dr. W. Mevius, Direktor des

Staatsinstituts für Allgemeine Botanik in Hamburg, die mir in ihren Instituten freundlich Arbeitsplätze zur Verfügung gestellt hatten.

Desgleichen danke ich den jüngeren Lehrkräften der genannten Institute, die mir bei meiner Arbeit behilflich waren.

Zuletzt danke ich bestens meinem Freunde, dem Wiss. Rat Dr. E. Inari, für seine Korrekturen.

Literatur

- Collander, R., und H. Bärlund, 1926: Über die Protoplasmapermeabilität von *Rhoeo discolor*. Soc. Sci. Fennica, Comm. Biol. II. 9.
- Hansteen-Cranner, 1922: Zur Biochemie und Physiologie der Grenzschichten lebender Pflanzenzellen. Meldinger fra Norges Landbrukshöiskole 2.
- Höber, R., 1924: Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe.
- und al., 1947: Physikalische Chemie, Bern.
- Kaho, H., 1921: Zur Kenntnis der Neutralsalzwirkungen auf das Pflanzenplasma. Biochem. Z. 120.
- 1923: Über die physiologische Wirkung der Neutralsalze etc. Acta et Comm. Univ. Dorpat. A V 4.
- 1926: Über den Einfluß der Temperatur auf die koagulierende Wirkung einiger Alkalisalze auf das Pflanzenplasma. Biochem. Z. 167.
- 1933: Das Verhalten der Pflanzenzelle gegen Schwermetallsalze. Planta 18.
- Küster, E., 1909: Ber. Dtsch. Bot. Ges. 27.
- 1910: Z. Bot. 2.
- Lepeschkin, W. W., 1910: Zur Kenntnis der Plasmamembran I u. II. Ber. dtsch. bot. Ges. 28, S. 98 u. 383.
- Pauli, Wo., und H. Handowsky, 1910: Biochem. Z. 24.
- Porges und Neubauer, 1907: Biochem. Z. 7.
- Fitting, H., 1915: Jb. wiss. Bot. 56.

Die Festigkeit der Bindung einiger basischer Farbstoffe in vitalgefärbten Pflanzenzellen

Von

Assunta Flasch

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 15 Textabbildungen

(Eingelangt am 14. Juni 1955)

Einleitung

Versuche über Vitalfärbung haben seit der grundlegenden Arbeit von Pfeffer (1886) immer wieder das Interesse der Zellphysiologen beansprucht. Läßt sich doch mit Hilfe dieser Methode der physiologisch fundamental wichtige Vorgang der Stoffbewegung in der lebenden Zelle, allerdings nur für eine begrenzte Auswahl von Stoffen, direkt unter dem Mikroskop beobachten. Eine weitere Fragestellung der Vitalfärbung beruht auf der Tatsache, daß sich die Farbstoffe nie gleichmäßig in der Zelle verteilen, sondern stets von bestimmten Zellteilen mehr oder weniger stark gespeichert werden. Die Frage lautet nun: Kann man aus der Tatsache, daß ein bestimmter Zellteil einen bestimmten Farbstoff speichert, etwas über die chemische oder physikalische Natur dieses Zellteiles aussagen? Der theoretische Unterbau der Vitalfärbung ist heute so weit gediehen, daß sich zu dieser Frage bereits einiges sagen läßt.

Vorbedingung für die Speicherung eines Farbstoffes innerhalb des Protoplasten ist es, daß der Farbstoff durch das lebende Plasma permeieren kann. Irwin (1923, 1926) und Strugger (1936 a, b, 1940) erkannten, daß die pH-Abhängigkeit der Aufnahme basischer Farbstoffe wesentlich darauf beruht, daß nur die elektrisch neutrale Farbbase leicht das lebende Plasma durchdringen kann, während den Kationen dieser Farbstoffe der Weg durchs Plasma versperrt ist. Drawert (1938, 1940, 1951) hat die Verhältnisse auf breiter Grundlage untersucht und festgestellt, daß die freie Farbbase sich mit Lipoidlösungsmitteln aus ihren Lösungen leicht ausschütteln läßt, was bei den Kationen der Farbstoffe nicht der Fall ist. So ergibt sich das Verständnis der Permeation basischer Farbstoffe zwanglos aus der Overtonschen Lipoidtheorie der Permeabilität: in dem pH-Bereich, in dem der Farbstoff in Form seiner Kationen vorliegt, kann er das

lebende Plasma nicht durchdringen. Wird jedoch der Umschlagspunkt des Farbstoffes nach der alkalischen Seite überschritten, so daß der Farbstoff in Form der Farbbasenmoleküle vorliegt, dann können diese auf Grund ihrer guten Lipoidlöslichkeit sehr rasch auf dem Lösungswege durch das Plasma permeieren und sich den gegebenen Verhältnissen entsprechend innerhalb der Zelle verteilen.

Die Art dieser Verteilung ist nun ein weiteres, von der Permeationstheorie weitgehend unabhängiges Problem, dem ebenfalls eine ganze Reihe von Arbeiten gewidmet ist. Die Speicherung kann entweder im Protoplasma oder im Zellsaft erfolgen. Bezüglich des letzteren war es schon seit langem aufgefallen, daß die Vakuolen verschiedener Zellen den gleichen Farbstoff in recht verschiedenen Farbtönen speichern können. Schon *Drawert* und *Strugger* kannten die sogenannte Mosaikfärbung der Unterepidermis austreibender Zwiebeln und das verschiedenartige Verhalten der Ober- und Unterepidermis des gleichen Objektes. *Höfler* (1947 a, b, 1949 a, b) hat dann eine Unterscheidung von wesentlicher Bedeutung getroffen. Er stellte fest, daß eine gewisse Type von Zellsäften, die den Fluoreszenzfarbstoff Akridinorange mit roter Fluoreszenzfarbe speichern, den Farbstoff wieder aus der Zelle entläßt, wenn man die Objekte in verdünnte Ammoniaklösung bringt. Eine andere Type von Zellsäften, die Akridinorange mit grüner Fluoreszenz speichert, behält den Farbstoff auch nach Behandlung mit Ammoniak. Es ist seit den Untersuchungen von *De Vries* (1871) bekannt, daß Ammoniak leicht durch das Plasma in den Zellsaft permeieren und denselben neutralisieren bzw. alkalisch machen kann. Die Farbspeicherung der erstgenannten Type von Zellsäften beruht demnach im wesentlichen auf der Voraussetzung, daß der Zellsaft schwach sauer ist. Wird die saure Reaktion durch Eindringen von Ammoniak aufgehoben, dann entweicht der Farbstoff. Diese Type nannte *Höfler* „leere“ Zellsäfte. Bei der anderen Type von Zellsäften, bei denen die Farbspeicherung durch eine Behandlung mit Ammoniak nicht beeinflusst wird, beruht der Anreicherungs Vorgang aller Wahrscheinlichkeit nach auf einer chemischen Bindung des Farbstoffes an bestimmte zelleigene Substanzen. *Höfler* prägte für diesen Typus den Ausdruck „volle“ Zellsäfte. Die Richtigkeit dieser Unterscheidung konnte in den letzten Jahren durch zahlreiche weitere Untersuchungen immer wieder bestätigt werden. *Wiesner* (1951) konnte volle und leere Zellsäfte auch mit Hellfeldfarbstoffen einwandfrei auseinanderhalten. *Härtel* (1951, 1952, 1953) wies unter anderem nach, daß die Farbspeicherung voller Zellsäfte durch Gerbstoffe bedingt sein kann. Weiters sind die Arbeiten von *Walldheim* (1949), *Porzer* (1952) und *Diskus und Kiermayer* (1954) zu nennen.

Die Arbeiten von *Höfler* und *Schindler* (1951, 1953, 1955) und *Hirn* (1953 a, b) weisen analoge Verschiedenheiten auch für die Zellsäfte von Algen nach.

Die Farbstoffbindung in leeren Zellsäften beruht auf einem einheitlichen und theoretisch leicht durchschaubaren Mechanismus: die in der Außenlösung enthaltenen Farbbasenmoleküle permeieren auf dem Lipoid-

weg durch das Plasma und bilden in dem sauren Zellsaft Ionen, denen der Rückweg durch das Plasma versperrt ist. Durch diese „Ionenfallenwirkung“ (Höfler) des Zellsaftes kommt es zu einer Anreicherung des Farbstoffes in der Vakuole bis auf ein Vielfaches der Außenkonzentration. Die bei diesem Färbemechanismus zu erwartenden quantitativen Beziehungen wurden jüngst von Kinzel (1954) errechnet. Dieser Mechanismus scheint bei allen leeren Zellsäften der gleiche zu sein.

Bei den vollen Zellsäften hingegen ist es unwahrscheinlich, daß es in ganz verschiedenen Zellen immer wieder die gleichen Stoffe sind, die den Farbstoff innerhalb des Zellsaftes in chemischer Bindung festhalten. Es ist vielmehr zu erwarten, daß eine ganze Reihe recht verschiedener chemischer Vorbedingungen zur Bindung basischer Farbstoffe imstande ist (vgl. Guilliermond u. Atkinson 1941 und P. Dangeard 1947). Es ist weiter anzunehmen, daß solche verschiedene Stoffe den Farbstoff nicht mit der gleichen Festigkeit binden werden, exakter ausgedrückt: daß die Dissoziationskonstanten der entstehenden Farbstoffverbindungen verschieden groß sein werden. Es zeigt sich nun, daß gefärbte Zellen, wenn sie in eine farblose Lösung gebracht werden, den Farbstoff mehr oder weniger rasch wieder an diese abgeben können. Dabei wird die Zeit, die bis zur Entfärbung der Zellsäfte verstreicht, wesentlich von der Festigkeit der Bindung des Farbstoffes an die im Zellsaft enthaltenen Speicherstoffe abhängen. Diese Problemstellung ist das Thema der vorliegenden Arbeit. Es sollte also zunächst die Festigkeit der Farbstoffbindung in vollen und vergleichsweise auch in leeren Zellsäften festgestellt werden.

Auch das Protoplasma vermag basische Farbstoffe zu speichern. Vor allem gilt dies für das tote Plasma. Beim Zelltod zerfällt ja der Eiweiß-Lipoid-Komplex, und die freigesetzten Proteinstoffe enthalten saure Gruppen, die sehr viele basische Farbstoffe mit großer Festigkeit binden können. Aber auch das lebendige Protoplasma kann manche basische Farbstoffe anreichern. Bei leeren Zellsäften ist es z. B. so, daß Farbstoffe, deren Umschlagspunkt weit im sauren Bereich liegt und die daher in schwach sauren Zellsäften keine Ionen bilden und in den Zellsäften nicht gespeichert werden können, so wie in den Drawertschen Ausschüttelungsversuchen in die Lipoidphase der Zelle, also in das lebende Plasma gehen (vgl. Drawert 1951, S. 103). Kann aber ein Farbstoff im Zellsaft Ionen bilden und daher von ihm gespeichert werden, dann wird er im lebenden Plasma nicht oder fast nicht angereichert. Bei Zellen mit leeren Zellsäften gehen also die Farbstoffe, deren Umschlagsbereich im alkalischen Bereich liegt (z. B. Neutralrot, Toluidinblau, Brillantkresylblau), in die Vakuolen, diejenigen aber, deren Umschlagspunkt im sauren Bereich liegt, z. B. Chrysoidin und Rhodamin B, ins Plasma. Es handelt sich hier also um eine physikochemisch erklärbare Verteilung der Farbstoffe auf Grund der Lipidlöslichkeit der Farbbasen. Bei vollen Zellsäften jedoch, bei denen die Vakuole allen genannten Farbstoffen gegenüber speicherfähig ist, kann sich der Farbstoff im Plasma nicht anreichern. So ist also eine vitale Anfärbung des Plasmas vor allem bei Zellen mit leeren Zellsäften möglich unter Verwendung solcher Farbstoffe, deren Umschlagspunkt im sauren

Bereich liegt, wie etwa des Chrysoidins oder des besonders schwer ionisierbaren Rhodamins B. Auch bei Zellen mit solcherart gefärbtem Plasma wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die langsame Farbstoffabgabe beim längeren Liegen in ungefärbten Lösungen untersucht. Am besten ließ sich dieser Vorgang an Plasmen verfolgen, die mit Rhodamin B gefärbt worden waren, da in diesem Falle noch sehr geringe Farbstoffmengen durch die gelbe Fluoreszenz nachzuweisen sind. Auf die Bedeutung des Rhodamins B als Vitalfarbstoff hat Strugger (1936 b, 1937, 1938 a, b) mehrfach hingewiesen; er stellte fest, daß das Rhodamin B einer der unschädlichsten Vitalfarbstoffe ist und auch als Plasmavitalfarbstoff verwendet werden kann.

Methodik

Die Farblösungen wurden nach der bekannten Weise (vgl. Strugger 1949, S. 134) mit Phosphatpuffern hergestellt und in verschiedenen pH-Stufen in der Konzentration 1:10.000 verwendet. Rhodamin B wurde in Leitungswasser in der Konzentration 1:1000 oder 1:5000 hergestellt. Der Puffer ist ein Gemisch aus primärem Kaliumphosphat und tertiärem Natriumphosphat. Das Mischungsverhältnis bzw. die pH-Werte sind jeweils bei den Versuchen angegeben.

Als Objekte dienten die Epidermen der Blattunterseite verschiedener Pflanzen bzw. die Stengelepidermis oder das Stengelparenchym und die Epidermen der Zwiebelschuppen von *Allium cepa* oder anderer Zwiebel.

Zur Bestimmung der Farbtintensität der mit Rhodamin B gefärbten Plasmen wurde ein von Dr. H. Kinzel konstruiertes Mikrokolorimeter verwendet, das an das Fluoreszenzmikroskop angeschlossen wurde und einen Farbvergleich im Mikroskop selbst zuließ. Auch die Intensität diffuser Vakuolenfärbung von Zellen, die mit Rhodamin B gefärbt wurden, konnte mit Hilfe eines Hellfeldkolorimeters bestimmt werden (Kinzel 1955).

Die Objekte wurden je nach der Eigenart des Farbstoffes 10 bis 20 Minuten lang gefärbt und dann in der ungefärbten Phosphatpufferlösung vom gleichen pH-Wert kurz ausgewaschen. Zur Prüfung der Festigkeit der Farbstoffbindung wurden die Schnitte dann in die ungefärbte Pufferlösung gelegt. Die mit Rhodamin B gefärbten Präparate kamen in Leitungswasser.

A. Vakuolenfärbung

I. Versuche mit Rhodamin B

Auch bei Rhodamin B kommt es bei verschiedenen Objekten zu den bekannten Typen der Farbstoffspeicherung, nämlich Diffusfärbung, Krümel-speicherung und Tröpfchenspeicherung (vgl. Drawert 1939). Bei allen Speichertypen konnten sowohl Objekte gefunden werden, die sich in Leitungswasser wieder entfärben ließen, als auch solche, deren Vakuolen keine Entfärbung mehr zeigten. Waldheim (1949) stellte fest, daß in den Gerbstoffzellen im *Carex*-Blatt bei Färbung mit Rhodamin B eine irreversible chemische Bindung des Farbstoffes mit den Gerbstoffkomponenten der Zellsäfte erfolgt. Bei einigen Objekten, die sich nicht mehr entfärben ließen, wurde daher die Gerbstoffprobe mit Coffein vorgenommen.

a) Diffusfärbung

Zunächst sollen die Objekte behandelt werden, deren Vakuolen sich in einer Rhodamin-B-Lösung 1 : 1000 oder 1 : 5000 diffus anfärben.

Die untere Blattepidermis von *Antirrhinum majus* wurde in einer Rhodamin-B-Lösung 1 : 5000 10 Minuten lang gefärbt, kurz in Leitungswasser ausgewaschen und hierauf im Mikroskop untersucht. Die Zellen zeigen diffuse, violette Vakuolenfärbung. Nun wurden die Schnitte in Leitungswasser gelegt und die Intensität der Vakuolenfärbung in bestimmten Zeitabständen beobachtet. Nach 30 Minuten war die Färbung der Vakuolen schon bedeutend schwächer geworden, aber immer noch gut zu erkennen. Nach 1 Stunde hingegen waren die Zellen nur mehr so blaß gefärbt, daß eine Färbung kaum mehr kenntlich war. Nach 1 Stunde 30 Minuten waren die Zellen wieder vollkommen entfärbt.

Diffuse Vakuolenfärbung zeigt bei gleicher Versuchsanordnung auch die untere Blattepidermis von *Hedera helix*. Die Zellen färben sich diffus rot-violett an, nur in einigen Zellen, vor allem am Schnitttrand und in den Schließzellen der Spaltöffnungen, treten auch blaue Farbstoffkrümel auf. Die Entfärbung einer diffus gefärbten Epidermiszelle von *Hedera helix* konnte ich im Hellfeld mit Hilfe des Mikrokolorimeters messen. Geeicht wurde mit einer 0,1% Rhodamin-B-Lösung. Das Mikrokolorimeter wurde an das Mikroskop angeschlossen und ließ einen Farbvergleich der Vakuolenfärbung mit der Eichungslösung im Mikroskop selbst zu.

Folgende Werte konnten gemessen werden:

9.30	9.5	13.00	3.4
10.10	6.7	15.00	3.0
11.00	5.3	17.00	2.8
12.00	4.0	9.00	1.0

$D_z = 19 \mu$ (vgl. Abb. 1¹).

Nach 24 Stunden ist also in den Zellen noch eine ganz blasse, kaum merkliche Vakuolenfärbung zu erkennen.

Auch die Zellen der unteren Blattepidermis von *Saintpaulia* färben sich mit Rhodamin B 1 : 5000 nicht einheitlich an. Während die Zellen der Schnittmitte diffuse Vakuolenfärbung zeigen, sind die Randzellen dicht von kleinen blauen Farbstoffkrümel erfüllt, die sich in lebhafter BMB befinden. Hier tritt also sowohl Diffusfärbung als auch Krümelspeicherung auf. Nach ungefähr 5 Stunden sind die Krümel in fast allen Zellen verschwunden, auch die Diffusfärbung der Zellen, die keine Krümel enthalten, ist bedeutend schwächer geworden. Nach 7 Stunden ist im Hellfeld bei den meisten Zellen keine Vakuolenfärbung mehr zu beobachten. Im Fluoreszenzmikroskop hingegen ist noch deutlich die gelbe Fluoreszenz sichtbar, die auch nach 24 Stunden noch erhalten ist.

Fast analog verhalten sich auch die Zellen der unteren Blattepidermis von *Taraxacum officinale* bei Färbung mit Rhodamin B 1 : 5000. Der Großteil der Zellen färbt sich diffus violett an, nur in einigen Zellen treten auch blaue Farbstoffkrümel auf. Außerdem kommt es in den Schließzellen der

¹ Für die photographischen Aufnahmen möchte ich Herrn Assistenten Dr. W. Uhl herzlich danken.

Spaltöffnungen zur Bildung einzelner roter Entmischungskugeln. Nach zweistündigem Aufenthalt in Wasser sind die Krümel meist wieder verschwunden, die Diffusfärbung und die Entmischungskugeln sind noch erhalten. Nach 24 Stunden sind die Epidermiszellen entfärbt, nur die Schließzellen

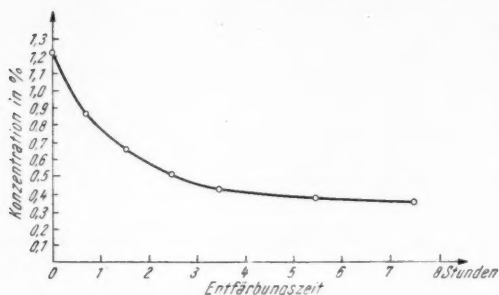


Abb. 1. *Hedera helix*.

der Spaltöffnungen zeigen noch schwache diffuse violette Vakuolenfärbung mit einzelnen roten Entmischungskugeln. Auch nach 48 Stunden ist in den Schließzellen immer noch eine blasse Färbung zu erkennen.

Evonymus europaea läßt bei gleicher Behandlung in den Zellen der unteren Blattepidermis diffuse, hellviolette Va-

kuolenfärbung erkennen, nur die Schließzellen der Spaltöffnungen sind von kleinen ungefärbten Kügelchen, aber auch von roten Entmischungskugeln erfüllt. Nach 24stündigem Liegen in Leitungswasser sind die Epidermiszellen wieder entfärbt, nur die Schließzellen der Spaltöffnungen enthalten noch eine oder zwei

Entmischungskugeln (Abb. 2).

Die Diffusfärbung in den Zellen der unteren Blattepidermis von *Bougainvillea glabra* durch Rhodamin B 1 : 1000 ist leicht wieder auswaschbar. Schon nach zweistündigem Liegen in Leitungswasser sind die Zellen wieder entfärbt, nur die Färbung in den Schließzellen der Spaltöffnungen ist länger zu beobachten.

Buxus sempervirens zeigt durch die sehr intensive diffuse Vakuolenfärbung einen Reichtum an Speicherstoffen in der Zelle an (vgl. Flasch u. Kinzel 1954). Mit Rhodamin B färben sich die Vakuolen so stark violett an, daß sie im Fluoreszenzmikroskop nicht wie gewöhnlich die gelbe Fluoreszenz des Rhodamins B zeigen, sondern fast rötlich fluoreszieren. In vereinzelten Zellen treten auch ein oder

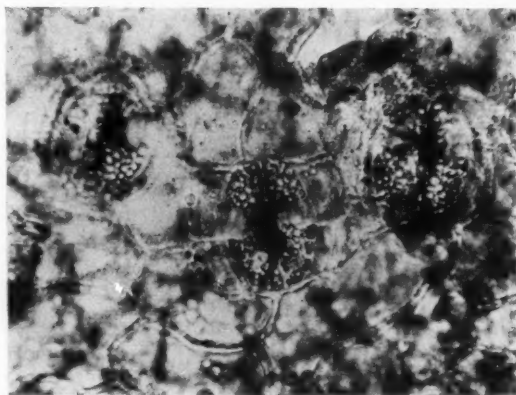


Abb. 2. *Evonymus europaea*. Untere Blattepidermis nach Färbung mit Rhodamin B.

zwei Entmischungskugeln auf. Nach 2 bis 3 Stunden Wässerung ist die Färbung schon bedeutend schwächer geworden, die Entmischungskugeln haben sich aufgelöst, und nach ungefähr 5 Stunden sind die Zellen vollkommen entfärbt. Nur im UV-Licht ist noch eine gelbe Fluoreszenz der Vakuolen zu beobachten, die nach 24 Stunden immer noch vorhanden ist.

Nur sehr schwach und leicht wieder auswaschbar ist die Diffusfärbung mit Rhodamin B 1 : 5000 in den Zellen der unteren Blattepidermis von *Piper nigrum*. Schon nach 4 Stunden ist im Hellfeld keine Färbung mehr zu beobachten und auch die gelbe Fluoreszenz im UV-Licht ist bedeutend schwächer geworden.

Während sich die Zellen der unteren Blattepidermis von *Tulipa gesneriana* mit Rhodamin B 1 : 5000 diffus violett anfärben, treten in den Schließzellen der Spaltöffnungen meist mehrere rote Entmischungskugeln auf. Doch schon nach $3\frac{1}{2}$ Stunden sind die Zellen im Hellfeld entfärbt und zeigen im UV-Licht keine Fluoreszenz mehr. Nur in den Schließzellen der Spaltöffnungen läßt sich noch eine Gelbfluoreszenz beobachten.

Sehr blasse diffuse Vakuolenfärbung zeigen nach 10 Minuten langer Färbung die Zellen der

unteren Blattepidermis von *Fittonia Verschoffeltii* im Hellfeld, im Fluoreszenzmikroskop hingegen fluoreszieren die Vakuolen intensiv gelbrot. Nach achttündigem Liegen in Leitungswasser sind die Zellen zum Großteil entfärbt und es läßt sich nur mehr eine ganz schwache gelbe Fluoreszenz der Vakuolen beobachten. Nach 24 Stunden sind die Zellen wieder vollkommen farblos, auch im UV-Licht ist keine Fluoreszenz mehr zu erkennen.

Die Zellen der unteren Blattepidermis von *Primula obconica* sind nach 10 Minuten langer Färbung in Rhodamin B 1 : 5000 diffus violett gefärbt. Im Fluoreszenzmikroskop leuchten diese Vakuolen intensiv gelbbraun. Nach 24 Stunden ist die Vakuolenfärbung nur mehr sehr blaß, stärker ist noch die gelbe Fluoreszenz im UV-Licht. Nach ungefähr 50 Stunden sind die Zellen vollkommen entfärbt. Die Beobachtung der Entfärbung einer Epidermiszelle mit Hilfe des Mikrokolorimeters ergab folgendes:

9.45	6,1	13.30	1,7
10.25	4,9	15.00	1,0
11.00	4,0	9.00	1,0
12.30	2,6	$D_z = 26 \mu$ (vgl. Abb. 3).	

Doch nicht bei allen Objekten ist die Diffusfärbung durch Rhodamin B in Leitungswasser wieder auswaschbar.

Die Idioblasten der inneren Zwiebelepidermis von *Colchicum autumnale* treten durch Färbung mit Rhodamin B ganz deutlich hervor (vgl. Scheidl

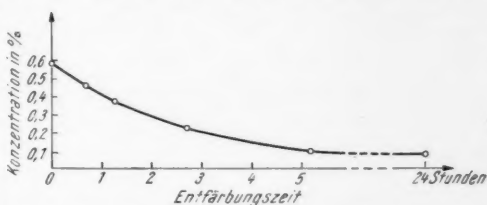


Abb. 5. *Primula obconica*.

1955). Während sich die Vakuolen der übrigen Epidermiszellen, die leere Zellsäfte besitzen, mit Rhodamin B nicht anfärben, färben sich die Idioblasten intensiv diffus violett an (Abb. 4). Auch nach tagelangen Liegen in Leitungswasser ist diese Diffusfärbung in den Vakuolen der Idioblasten unverändert erhalten.

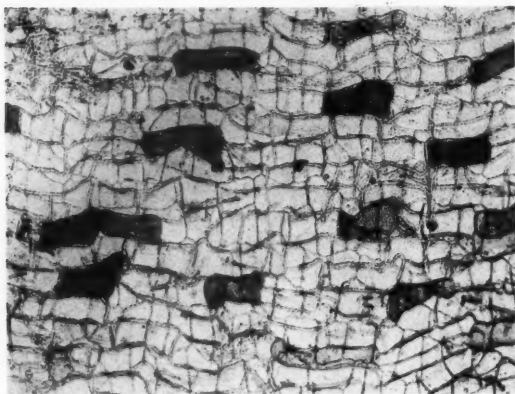


Abb. 4. *Colchicum autumnale*. Zwiebelinnenepidermis nach Färbung mit Rhodamin B.

Ein ähnliches Verhalten zeigen auch die mit Rhodamin B 1:1000 gefärbten Zellen der unteren Blattepidermis von *Ilex aquifolium* und *Hakea saligna*. In den Vakuolen tritt nach 10 Minuten langer Färbung intensive rotviolette Diffusfärbung auf, die auch nach 48stündigem Liegen in Leitungswasser noch zu beobachten ist.

b) Krümelspeicherung

In den Vakuolen vieler Objekte wird Rhodamin B aber nicht diffus, sondern in Form kleiner Farbstoffkrümel gespeichert. Auch bei diesem Typus der Farbstoffspeicherung konnten Zellen beobachtet werden, die sich durch Leitungswasser wieder entfärben lassen und solche, bei denen es zu keiner Entfärbung mehr kommt.

Die Zellen der unteren Blattepidermis von *Salvinia natans* zeigen bei 10 Minuten langer Färbung in Rhodamin B 1:1000 diffuse, blaßrote Vakuolenfärbung und außerdem treten in den Zellen blaue, in lebhafter BMB befindliche Farbstoffkrümel auf. Liegen die Zellen 1 Stunde in Leitungswasser, so ist die Diffusfärbung verschwunden, die blauen Farbstoffkrümel hingegen sind fast unverändert erhalten. Nach 24 Stunden sind in einzelnen Zellen die Krümel immer noch zu beobachten, und erst nach 48 Stunden sind die Epidermiszellen vollkommen entfärbt.

Bei gleicher Versuchsanordnung tritt auch in den Zellen der unteren Blattepidermis von *Passiflora coerulea* neben violetter Diffusfärbung Krümelspeicherung in den Zellen auf. Manchmal treten auch kleinere Kügelchen in den Zellen auf, so daß dieses Objekt eine Art Übergang zwischen Krümelspeicherung und Tröpfchenspeicherung darstellt. Doch ist diese Färbung verhältnismäßig leicht wieder auswaschbar, denn schon nach 4 Stunden sind die Krümel oder Tröpfchen aufgelöst und nach 6 Stunden sind die Epidermiszellen wieder entfärbt.

Leicht wieder auswaschbar ist auch die Färbung mit Rhoda-

min B 1 : 5000 in den Zellen der unteren Blattepidermis von *Chrysanthemum leucanthemum*. Nach 10 Minuten Färbezeit treten in den Zellen außer diffuser Vakuolenfärbung auch blaue Farbstoffkrümel auf. Legt man diese Schnitte in Leitungswasser, so sind schon nach 1 Stunde in den meisten Zellen diese Krümel wieder verschwunden und auch die Diffusfärbung ist merklich schwächer geworden. Nach 24 Stunden sind die Epidermiszellen entfärbt.

Verhältnismäßig rasch entfärben sich auch die Zellen der unteren Blattepidermis von *Peperomia Broadwayi*, *Peperomia Verschaffeltii*, *Viola tricolor*, *Begonia hydrochondifolia* und *Acalypha vilcesiani* nach Färbung mit Rhodamin B 1 : 1000. Bei diesen Objekten treten in den Zellen violette Farbstoffkrümel in BMB auf, die aber nach ungefähr dreistündigem Liegen in Leitungswasser wieder verschwunden ist. Nach 24 Stunden sind die Zellen vollkommen entfärbt.

Bei gleicher Versuchsanordnung sind die Zellen der unteren Blattepidermis von *Blechnum occidentale* und *Begonia maculata* dicht von kleinen, in lebhafter BMB befindlichen Farbstoffkrümeln erfüllt. Nachdem die Schnitte 24 Stunden in Leitungswasser gelegen sind, sind die Krümel der meisten Zellen verschwunden, nur vereinzelt treten sie noch in Zellen der Schnittmitte auf. Nach 48 Stunden sind auch diese Zellen vollkommen entfärbt.

Auch *Centradenia floribunda* und *Euphorbia splendens* lassen in den Zellen der unteren Blattepidermis bei Färbung mit Rhodamin B 1 : 1000 KrümelSpeicherung neben diffuser Vakuolenfärbung erkennen. Nachdem die Schnitte 24 Stunden in Leitungswasser gelegen sind, sind die Epidermiszellen wieder e n t f ä r b t.

Färbt man die untere Blattepidermis von *Ipomoea Batatas* 10 Minuten in Rhodamin B 1 : 5000, so treten in den Zellen viele kleine Farbstoffkrümel auf, die in den Schließzellen der Spaltöffnungen und in deren Nebenzellen besonders dicht liegen. Im Fluoreszenzmikroskop leuchten diese Krümel intensiv rot auf. Legt man die Schnitte in Leitungswasser, so sind die Farbstoffkrümel auch nach 48 Stunden noch unverändert erhalten.

Auch die Zellen der unteren Blattepidermis von *Eucalyptus globifer* speichern Rhodamin B in Form von Krümeln, die sich meist nach einigen Minuten in der Mitte der Zelle zusammenballen. Auch hier tritt nach 48stündigem Liegen in Leitungswasser keine Entfärbung der Zellen ein.

Ähnlich verhalten sich bei gleicher Behandlung die Zellen der unteren Blattepidermis von *Azalea indica*, *Rhus sp.* und *Paeonia arborea*. Nach 10 Minuten langer Färbung in Rhodamin B 1 : 5000 sind die Epidermiszellen dicht von blauen Farbstoffkrümeln erfüllt, die im UV-Licht rot fluoreszieren. Auch nach tagelangem Liegen in Leitungswasser bleiben diese Krümel unverändert in den Zellen erhalten².

Ebenso lassen sich die Krümel, die in den Zellen der unteren Blattepidermis von *Psidium Gujava*, *Pelargonium zonale*, *Dipteracanthus longiflorus*, *Myrsine africana*, *Epilobium parviflorum* und *Fuchsia sp.* bei Färbung mit

² Bei *Azalea indica* Gerbstoffnachweis mit Coffein positiv.

Rhodamin B 1:5000 auftreten, durch Leitungswasser nicht mehr entfärben³.

Die Zellen der Zwiebelepidermis von *Tulipa gesneriana* besitzen meist leere Zellsäfte, nur einzelne Idioblasten, die volle Zellsäfte haben, färben sich mit Rhodamin B 1:1000 stark an. Ihre Vakuolen sind von blau-violetten Farbstoffkrümeln erfüllt, außerdem ist eine schwächere violette Diffusfärbung des Zellsaftes zu beobachten. Auch nach tagelangem Liegen in Leitungswasser tritt keine Veränderung in den Idioblasten ein.

c) Tröpfchenspeicherung

Häufig wird Rhodamin B aber auch in Form kleiner Tröpfchen oder Kügelchen in den Vakuolen der Zellen gespeichert.

Zu den gebräuchlichsten Objekten der Vitalfärbung gehören die Innen-

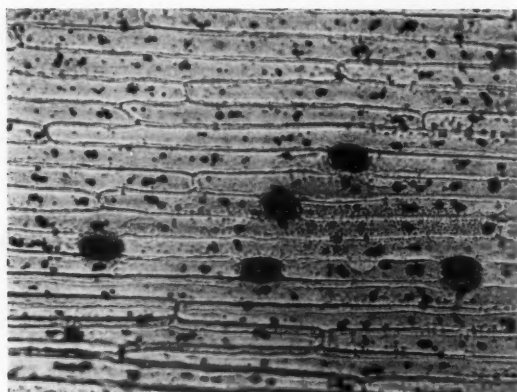


Abb. 5. *Galanthus nivalis*. Stengelepidermis nach Färbung mit Rhodamin B.

und Außenepidermen der Zwiebel von *Allium cepa*. Bei Färbung mit Rhodamin B 1:5000 treten in den Zellen der Außenepidermis außer der violetten Diffusfärbung der Vakuolen noch schöne rubinrote Entmischungskugeln auf (vgl. Drawert 1939, Strugger 1949). Werden diese Schnitte in Leitungswasser gebracht, so fließen die Kugeln bald zu einer größeren zusammen, die noch lange sichtbar

bleibt. Erst nach 48 Stunden sind die Entmischungskugeln vollständig aufgelöst und die Zellen entfärbt.

Sehr rasch wieder entfärbbar sind die Zellen der unteren Blattepidermis von *Lupinus hybr.* nach Färbung mit Rhodamin B 1:5000. Außer violetter Diffusfärbung treten auch hier mehrere rote Entmischungskugeln in den Zellen auf. Doch schon nach einstündigem Liegen in Leitungswasser sind diese verschwunden, und auch die Diffusfärbung ist nur mehr ganz schwach zu erkennen. Nach 3 Stunden sind die Zellen wieder entfärbt.

Fast ebenso rasch auswaschbar sind die mit Rhodamin B 1:5000 gefärbten Zellen der Stengelepidermis von *Galanthus nivalis*. Liegen die Schnitte 1½ Stunden in Leitungswasser, so sind die Entmischungskugeln in den Zellen aufgelöst, und nach 8 Stunden sind die Zellen wieder vollständig farblos.

³ Bei *Psidium Gujava*, *Pelargonium zonale*, *Myrsine africana* und *Fuchsia* sp. verlief der Gerbstoffnachweis mit Coffein positiv.

Häufig kann man in der Stengelepidermis auch eine Spaltöffnungsanomalie beobachten, im Aussehen jedoch anders als die aus der Literatur bekannten Spaltöffnungsanomalien (vgl. Kropfitch 1951, Weber 1945). Die Spaltöffnungen liegen in diesem Falle nicht wie üblich einzeln verstreut in der Epidermis (Abb. 5), sondern es kommen jeweils zwei Spaltöffnungen nahe beieinander zu liegen. Die einander zugekehrten Schließzellen stehen durch eine schmale Querverbindung in Zusammenhang, doch sind die Protoplasten der einzelnen Zellen deutlich abgegrenzt (Abb. 6).

Plantago media zeigt bei Färbung mit Rhodamin B 1 : 5000 kleine Entmischungskugeln in den Zellen der unteren Blattepidermis, größere treten in den Schließzellen der Spaltöffnungen und in den Zellen der Drüsenhaare auf. Während die Epidermiszellen nach 6 bis 8 Stunden wieder entfärbt sind, lassen sich die Entmischungskugeln in den Drüsenhaaren nicht entfärben (Abb. 7).

Eine Sonderstellung nehmen auch die Spaltöffnungen in der unteren Blattepidermis von *Caltha palustris* ein. Die Zellen färben sich mit Rhodamin B 1 : 5000 diffus violett an, und überdies treten rote Entmischungskugeln auf. Nach 24stündiger Wässerung ist in den Epidermiszellen nur mehr eine ganz blasse Diffusfärbung zu erkennen, die Entmischungskugeln sind aufgelöst. Nur in den Schließzellen der Spaltöffnungen ist die violette Diffusfärbung noch intensiver, und hier sind auch noch 1 bis 2 Entmischungskugeln vorhanden, die sich nicht entfärben lassen.

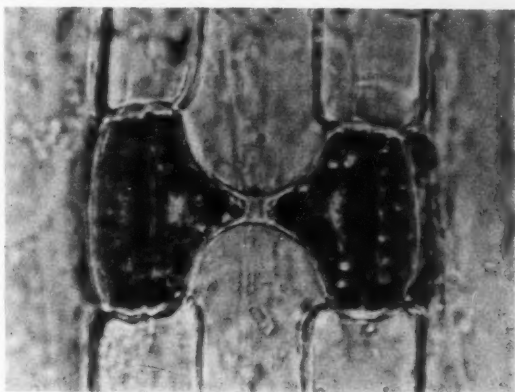


Abb. 6. *Galanthus nivalis*. Spaltöffnungsanomalie in der Stengelepidermis.

Leicht auswaschbar ist auch die Tröpfchenspeicherung in den Zellen der unteren Blattepidermis von *Iris pumila*. Schon nach dreistündigem Liegen in Leitungswasser sind die Entmischungskugeln in den Zellen gänzlich aufgelöst, nur die violette Diffusfärbung ist noch zu beobachten. Nach 24 Stunden sind die Epidermiszellen wieder vollständig entfärbt.

Bei gleicher Behandlung treten auch in den Zellen der unteren Blattepidermis von *Gentiana cruciata* außer der Diffusfärbung auch noch mehrere rote Entmischungskugeln in lebhafter BMB auf. Liegen diese Zellen 24 Stunden in Leitungswasser, so sind die Entmischungskugeln aufgelöst, nur die diffuse Vakuolenfärbung ist noch ganz schwach zu erkennen, doch nach ungefähr weiteren 3 Stunden ist auch diese verschwunden.

Auch die Zellen der unteren Blattepidermis von *Thea sinensis* und

Cynanchum vincetoxicum färben sich bei gleicher Versuchsanordnung diffus violett an, und überdies treten in den Zellen einige rubinrote Entmischungskugeln auf. Nach einiger Zeit fließen diese zusammen, und nach 6 Stunden sind in den diffus gefärbten Epidermiszellen noch 1 bis 2 Entmischungskugeln vorhanden. Erst nach 48 Stunden sind die Epidermiszellen wieder vollständig entfärbt.

Anders aber verhalten sich die Entmischungskugeln, die bei Färbung mit Rhodamin B 1 : 5000 in den Zellen der Blattunterseite von *Bignonia unguis* auftreten. Während hier die Diffusfärbung nach 24stündigem Liegen

in Leitungswasser wieder ausgewaschen ist, sind die Entmischungskugeln, die in den Zellen meist zu zwei oder drei größeren Kugeln zusammengefloßen sind, noch erhalten. Auch nach 48 Stunden sind in einigen Zellen noch Entmischungskugeln zu beobachten.

Färbt man in gleicher Weise die Zellen der unteren Blattepidermis von *Aspidium falcatum*, so treten in den Zellen viele kleine



Abb. 7. *Plantago media*. Untere Blattepidermis nach Färbung mit Rhodamin B.

Kügelchen auf, die sich in lebhafter BMB befinden. Diffusfärbung ist nicht zu beobachten. Läßt man diese Zellen auch mehrere Tage in Leitungswasser liegen, so tritt keine Veränderung ein, die kleinen Entmischungskugeln lassen sich nicht entfärben.

Die folgenden Tabellen geben eine Übersicht über die Entfärbungszeiten der einzelnen Objekte (Abb. 8, 9, 10).

II. Versuche mit Chrysoidin

Chrysoidin, das zuerst durch Ruhland (1912), später durch Schaeede (1923, 1924), Wulff (1934), Lanz (1936), Guilliermond und Gautheret (1938 a, b), Drawert (1940) und zuletzt durch Hofmeister (1948) eingehender untersucht und beschrieben wurde, gehört zu den Azofarbstoffen. Sein Umschlagpunkt liegt bei pH 5,5, also noch im sauren Bereich, und daher vermag Chrysoidin wie Rhodamin B in Zellen mit leeren Zellsäften, wenn deren pH-Wert nicht zu einer Dissoziation des Farbstoffes ausreicht, Plasmafärbung hervorzurufen.

Färbt man die Innenepidermis der Zwiebel von *Allium cepa* in Chrysoidin 1 : 10.000 bei pH 7,1 15 bis 30 Minuten lang an, so kommt es nur zu einer Plasmaanfärbung.

Hingegen färben sich die vollen Zellsäfte der Außenepidermis von *Allium cepa* mit Chrysoidin 1 : 10.000 bei pH 7,1 intensiv diffus gelbbraun an. Nach längerem Liegen in der ungefärbten Pufferlösung ist die Farbintensität in den Zellen bereits bedeutend schwächer geworden, doch nach 24 Stunden ist eine schwache Gelbfärbung der Vakuolen noch zu erkennen.

Färbt man die Zellen der Zwiebelepidermis von *Tulipa gesneriana* in Chrysoidin 1 : 10.000 bei pH 7,1 15 bis 30 Minuten lang an, so treten die Idioblasten mit vollen Zellsäften deutlich hervor (Scheidl 1955). Wäh-

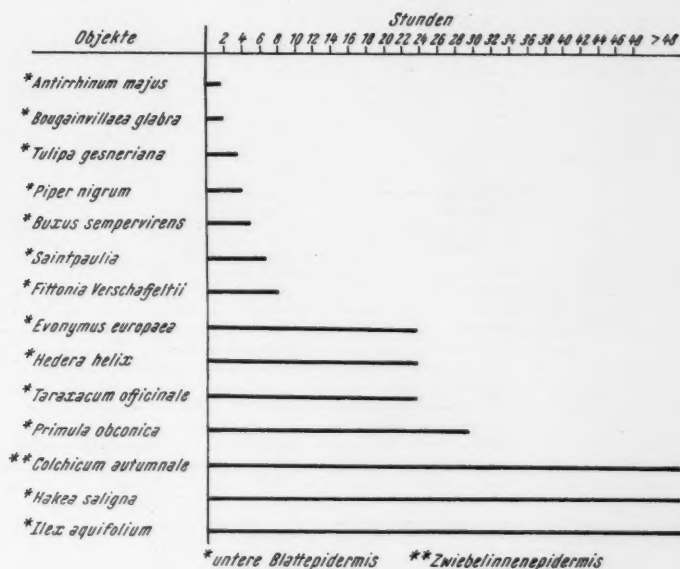


Abb. 8. Diffusfärbung.

rend in diesen Zellen die Vakuolen diffus gelbbraun gefärbt sind, ist in den Zellen mit leeren Zellsäften nur eine ganz schwache Plasmafärbung zu beobachten. Nach 24stündigem Liegen in der ungefärbten Pufferlösung ist die Färbung der Idioblasten noch erhalten, die Plasmafärbung der übrigen Zellen hingegen ist nicht mehr zu erkennen.

In den Zellen der unteren Blattepidermis von *Aspidium falcatum* kommt es bei Färbung mit Chrysoidin 1 : 10.000 bei pH 7,1 außer zu einer blaßgelben Diffusfärbung der Vakuolen auch noch zur Bildung von braunen oder rotbraunen Entmischungskugeln verschiedener Größe, die sich in lebhafter BMB befinden. Liegen die Schnitte 6 Stunden im ungefärbten Puffer, so ist in vielen Zellen die Färbung blasser geworden oder verschwunden. Nach 24 Stunden sind die meisten Zellen farblos, nur in einigen sind noch kleine Entmischungskugeln erhalten geblieben.

III. Versuche mit Neutralrot

Neutralrot, ein Azinfarbstoff, ist einer der meistverwendeten Vitalfarbstoffe und zur Unterscheidung voller und leerer Zellsäfte vorzüglich geeignet. Sein Umschlagspunkt liegt bei pH 7,4.

Als erste Objekte wählte ich wieder die Epidermen der Schuppen von *Allium cepa*. Schnitte der Zwiebelinnen- sowie -außenepidermis wurden in Neutralrotlösungen 1 : 10.000 von gestuften pH-Werten 10 Minuten lang gefärbt und in der ungefärbten Pufferlösung kurz ausgewaschen. Es ließen sich hier dann die bekannten Erscheinungen der Membranfärbung im

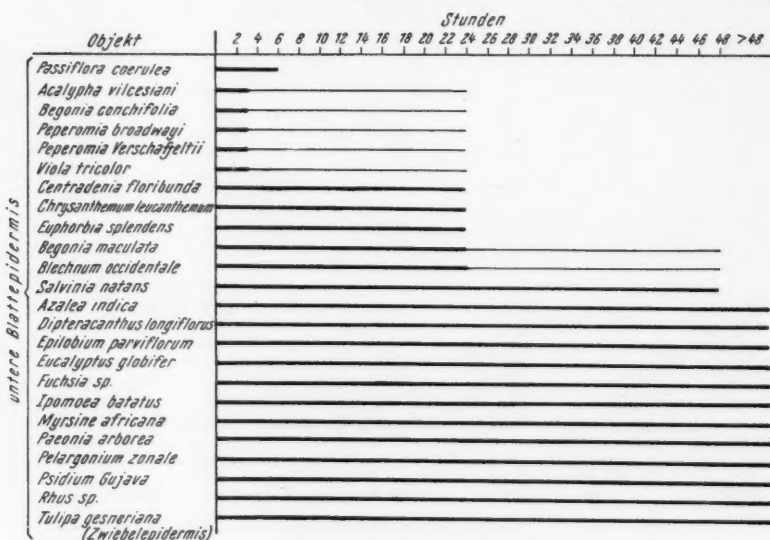


Abb. 9. Krümelspeicherung.

sauren Bereich und der Vakuolenfärbung im basischen Bereich beobachten. Ungefähr bei pH 6,0 beginnend, sind die Vakuolen der Zellen der Außenepidermis diffus violett gefärbt, charakteristisch für volle Zellsäfte, während die Zellen der Innenepidermis in diesem pH-Bereich erdbeerrrote Färbung, die typische Färbung der leeren Zellsäfte, zeigen (vgl. Wiesner 1950).

Nach der Färbung wurden die Schnitte in den ungefärbten Puffer von gleichem pH gelegt und darin belassen, um feststellen zu können, ob eine Entfärbung der Zellen eintritt. Die Schnitte wurden jeweils nach 15 bis 30 Minuten kontrolliert.

In den Zellen der Innenepidermis tritt nun bald eine Änderung auf. Die erdbeerrrote Diffusfärbung der Zellen ist nach 2 bis 3 Stunden schon bedeutend schwächer geworden, nach 6 bis 7 Stunden sind einzelne Zellen bereits wieder farblos. Nach 24 Stunden sind alle Zellen wieder entfärbt.

Die Vakuolen der Zellen der Außenepidermis hingegen lassen nach 24stündigem Liegen in der ungefärbten Pufferlösung noch intensiv die violette Diffusfärbung erkennen. Eine Entfärbung dieser Vakuolen konnte nicht festgestellt werden.

Ebenso wurde die untere Blattepidermis von *Salvinia natans* in Neutralrotlösungen 1 : 10.000 von verschiedenen pH-Werten gefärbt. Bei pH 3,1 tritt rote Membranfärbung auf, die Vakuolen sind noch ungefärbt. Bei pH 4,8 sind schon in einigen Vakuolen violette Farbstoffkrümel zu sehen, die Membranfärbung ist bedeutend schwächer. Ab pH 6,0 zeigen sich in allen Zellen violette Farbstoffkrümel in lebhafter BMB.



Abb. 10. Tröpfchenspeicherung.

Die Schnitte wurden nun wieder in die ungefärbte Pufferlösung gelegt und in bestimmten Zeitabständen kontrolliert. Auch hier konnte nach 48stündigem Liegen in der ungefärbten Pufferlösung keine Entfärbung der Zellen festgestellt werden.

Ein ähnliches Verhalten bei gleicher Versuchsanordnung zeigt die untere Blattepidermis von *Gentiana cruciata*. Färbt man Zellen der unteren Blattepidermis in Neutralrot 1 : 10.000, so treten außer der diffusen Vakuolenfärbung, bei ungefähr pH 4,8 beginnend, in den Vakuolen rubinrote Entmischungskugeln in lebhafter BMB auf. Doch auch diese Art der Farbstoffspeicherung zeigt bei 48stündigem Liegen im ungefärbten Puffer keine Veränderung.

Eine Reihe weiterer Objekte wurde in der gleichen Art gefärbt und dann beobachtet, doch bei keinem Objekt, das den charakteristischen Farb-

ton der vollen Zellsäfte hatte, konnte auch nach tagelangem Liegen in der ungefärbten Pufferlösung eine auffallende Veränderung der Farbtintensität festgestellt werden.

Gefärbt wurden wieder die unteren Blattepidermen verschiedener Pflanzen, die teils Diffusfärbung, teils Krümel- oder Tröpfchenspeicherung zeigten.

Diffuse Vakuolenfärbung trat bei folgenden Objekten auf: *Viola tricolor*, *Veratrum nigrum*, *Polygonatum verticillatum*, *Platanthera bifolia*, *Antirrhinum majus*, *Tradescantia purpusii*, *Dianthus barbatus*, *Hedera helix*, *Dieffenbachia picta*, *Buxus sempervirens*.

Krümelspeicherung zeigten die Zellen der unteren Blattepidermis von: *Aspidium falcatum*, *Fuchsia* sp., *Hedera helix* (in den Randzellen), *Peperomia broadwayi*, *Bougainvillea glabra*, *Philodendron* sp., *Ilex aquifolium*, *Psidium Gujava*, *Blechnum brasiliensis*, *Centradenia floribunda*, *Saintpaulia*, *Daucus carota* (Stengelepidermis).

Tröpfchenspeicherung hingegen war bei folgenden Objekten zu beobachten: *Aster chinensis*, *Pitosporum crassifolium*, *Peperomia magnoliaefolia*, *Theobroma Cacao*, *Euphorbia splendens*, *Rosa sinensis*, *Rhoeo discolor* (Stengelparenchym).

Weiters wurde untersucht, ob Temperaturerhöhung der ungefärbten Pufferlösung die Festigkeit der Farbstoffbindung beeinflusst. Mit Hilfe eines durch elektrischen Strom heizbaren Mikroskoptisches wurde die reine Pufferlösung durch die gefärbten Präparate bei 35–40° C durchgesaugt. Es machte sich auch bei dieser Behandlung keine wesentliche Änderung in den gefärbten Zellen bemerkbar.

Neutralrot konnte also bei diesen Versuchen aus vollen Zellsäften nicht mehr ausgewaschen werden, bei leeren Zellsäften hingegen ließ sich eine Entfärbung beobachten.

IV. Versuche mit Brillantkresylblau

Brillantkresylblau gehört zu den Oxazinfarbstoffen und ist einer der am häufigsten verwendeten Vitalfarbstoffe. Volle und leere Zellsäfte werden auch durch diesen Farbstoff verschieden gefärbt. Volle Zellsäfte speichern Brillantkresylblau mit grünblauer Farbe, leere färben sich intensiv blau an. Der Umschlagpunkt liegt im alkalischen Bereich, ungefähr bei pH 8,0.

Gefärbt wurden wieder die Epidermen der Zwiebel von *Allium cepa* sowie die untere Blattepidermis einiger anderer Objekte, so z. B. von *Andromeda japonica* oder *Aspidium falcatum*. Doch bei keinem Objekt konnte nach längerem Liegen der gefärbten Zellen in der farblosen Pufferlösung eine Entfärbung festgestellt werden.

V. Versuche mit Toluidinblau

Als nächsten Farbstoff wählte ich Toluidinblau, das zu den basischen Thiazinfarbstoffen gehört. Es besitzt metachromatische Eigenschaften und

ist ebenfalls zur Unterscheidung voller und leerer Zellsäfte geeignet (Czaja 1934, 1937, Drawert 1940, Wiesner 1951, Höfler u. Schindler 1951). Der Umschlagspunkt dieses Farbstoffes liegt relativ hoch im alkalischen Bereich, bei ungefähr pH 9,5 (Drawert 1940).

Färbt man die Innenepidermis der Zwiebelschuppe von *Allium cepa* in einer Toluidinblaulösung 1 : 10.000 von pH 10,1 10 Minuten lang an, so tritt in den Vakuolen blauviolette Diffusfärbung auf. Die Vakuolen der Zellen der Außenepidermis hingegen färben sich bei gleicher Behandlung grünblau an.

Legt man nun die gefärbten Epidermen in die ungefärbte Pufferlösung, so wird nach kurzer Zeit, ungefähr 15 Minuten, die Färbung in den Vakuolen der vollen Zellsäfte anscheinend intensiver, die Färbung der leeren Zellsäfte bleibt unverändert. Nach 48 Stunden ist die Färbung der vollen sowie der leeren Zellsäfte noch deutlich erhalten.

Schnitte der unteren Blattepidermis von *Viola tricolor* wurden in einer Toluidinblaulösung 1 : 10.000 von pH 11,6 10 Minuten lang gefärbt. Hierauf wurden die Schnitte in den ungefärbten Puffer von gleichem pH gelegt. Auch am zweiten Tag nach der Färbung zeigten die Zellen noch die diffuse grünblaue Vakuolenfärbung, die an Intensität nicht nachgelassen hat.

Auch bei Objekten, die Krümel- oder Tröpfchenspeicherung zeigten, wie z. B. die untere Blattepidermis von *Peperomia Broadwayi*, *Bougainvillea glabra* u. a., ließ sich nach langem Liegen der Schnitte in der ungefärbten Pufferlösung keine Entfärbung feststellen.

Diffusfärbung zeigten folgende Objekte: *Platanthera bifolia*, *Convallaria majalis*, *Polygonatum verticillatum*, *Aspidium falcatum*, *Daucus carota* (Stengelepidermis).

KrümelSpeicherung trat in den Zellen der unteren Blattepidermis auf von: *Bougainvillea glabra*, *Euphorbia splendens*, *Blechnum occidentale*.

Tröpfchenspeicherung ließ sich deutlich erkennen bei: *Peperomia Broadwayi*.

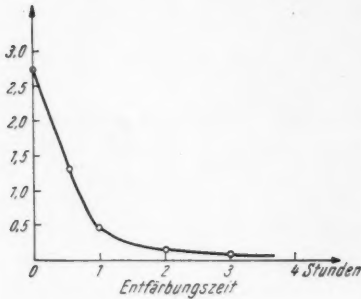
B. Plasmafärbung

Da Rhodamin B ein im biologischen pH-Bereich elektroneutraler Farbstoff ist, seine Moleküle also nur schwer in Ionen gespalten werden können, kann dieser Farbstoff in speicherstofffreien Vakuolen („leere“ Zellsäfte nach Höfler) nicht gespeichert werden. Wenn der Farbstoff nicht in der wäßrigen Phase der Zelle gespeichert werden kann, so wird er in der Lipoidphase gespeichert, also im Plasma. Rhodamin B vermag also bei Zellen mit leeren Zellsäften nur das Plasma anzufärben.

Der Umschlagspunkt des Chrysoidin liegt bei pH 5,5, also verhältnismäßig tief im sauren Bereich, und daher reicht die Azidität des Zellsaftes meist nicht mehr zu einer Ionisierung des Farbstoffes aus. Aus diesem Grunde läßt sich auch mit Chrysoidin bei leeren Zellsäften Plasmafärbung hervorrufen.

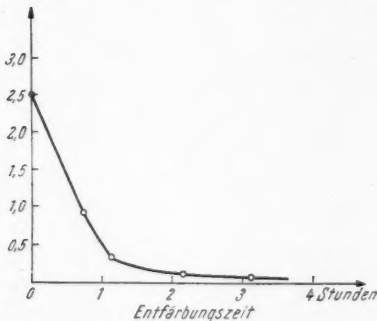
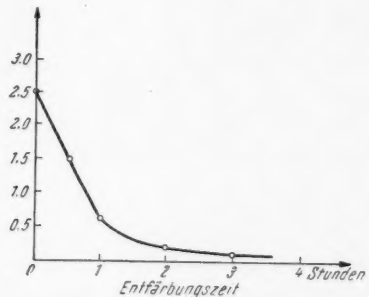
I. Versuche mit Rhodamin B

Färbt man die Innenepidermis von *Allium cepa* in einer Rhodamin-B-Lösung 1 : 5000 in Leitungswasser 10 Minuten lang an und wäscht den Schnitt kurz in Leitungswasser aus, so ist unter dem Mikroskop folgendes zu beobachten: im Hellfeld erscheint die Vakuole ungefärbt oder nur ganz schwach rotviolett gefärbt, im UV-Licht zeigt sie blaßgelbe Fluoreszenz. Diese Färbung ist in Leitungswasser rasch wieder auswaschbar. Das Protoplasma aber, das bei Vakuolenkontraktion in den Ecken der Zellen besonders gut sichtbar ist, zeigt violette Färbung im Hellfeld und lichtgelbe Fluoreszenz im UV-Licht.

Abb. 11. *Allium cepa*.

Legt man nun den Schnitt in Leitungswasser und beobachtet in kurzen Zeitabständen weiter, so ist es auffallend, daß in der ersten Stunde die Färbungsintensität des gefärbten Plasmas rasch abnimmt und dann nur mehr langsam schwächer wird. Zu einer vollständigen Entfärbung kommt es bei manchen Objekten gar nicht.

Ein ähnliches Verhalten wie die Innenepidermis von *Allium cepa* zeigen bei gleicher Versuchsanordnung auch die Epidermen der Zwiebel von

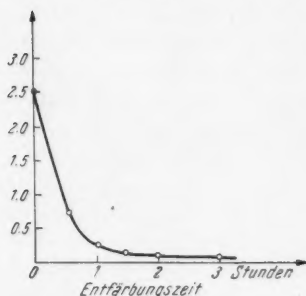
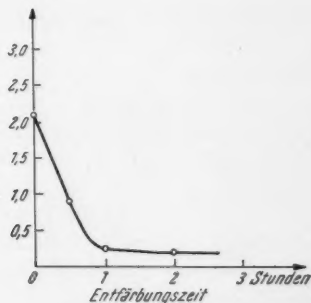
Abb. 12. *Allium sativum*.Abb. 13. *Lilium candidum*.

Allium sativum, *Allium porrum*, ferner die Zellen des Stengelparenchyms von *Lilium candidum*, *Calla* u. a. Nicht bei allen Zellen, deren Vakuolen leere Zellsäfte besitzen, läßt sich die Plasmafärbung so gut beobachten wie bei diesen Objekten.

Die folgenden Kurven zeigen die Geschwindigkeit der Plasmaentfärbung an. Die Werte wurden mit Hilfe von Kinzels Mikrokolorimeter im Fluoreszenzmikroskop gemessen (Abb. 11, 12, 13, 14, 15).

<i>Allium cepa</i> :		<i>Allium sativum</i> :		<i>Lilium candidum</i> :	
9.50	202	13.15	208	8.40	205
10.20	218	13.55	224	9.10	217
10.50	233	14.25	236	9.40	229
11.50	241	15.25	241	10.40	238
12.50	245	16.25	246	11.40	245
nach 24 St.	245	16.55	248	nach 24 St.	245

<i>Calla</i> :		<i>Allium porrum</i> :	
10.15	205	13.30	210
10.45	226	14.00	224
11.15	236	14.30	238
11.45	240	15.30	238
12.15	243		
13.15	245		

Abb. 14. *Calla*.Abb. 15. *Allium porrum*.

II. Versuche mit Chrysoidin

Hofmeister (1948) konnte feststellen, daß die durch Chrysoidin hervorgerufene Plasmafärbung verschiedener Objekte (z. B. die Zwiebelepidermis von *Narcissus pseudonarcissus*, die Stengelepidermis von *Solanum tuberosum* u. a.) wieder entfärbbar ist.

Färbt man die Innenepidermis der Zwiebel von *Allium cepa* in Chrysoidin 1 : 10.000 bei pH 7,1 15 bis 30 Minuten lang an, so färbt sich das Plasma schwach gelblich, auch werden einige Körnchen im Plasma sichtbar. Legt man die Schnitte nun in die ungefärbte Pufferlösung von gleichem pH, so ist nach 24 Stunden keine Färbung des Plasmas mehr zu erkennen.

Ähnliches läßt sich auch an anderen Objekten mit leeren Zellsäften beobachten, so z. B. an der Zwiebelepidermis von *Tulipa gesneriana* und im Stengelparenchym von *Lilium candidum*. Nach 24 Stunden war das Plasma meist wieder entfärbt.

Zusammenfassung

Die Versuche über die Festigkeit der Farbstoffbindung in vitalgefärbten Pflanzenzellen haben zunächst für die Vakuolenfärbung folgendes gezeigt:

Rhodamin B läßt sich aus den gefärbten Zellen vieler Objekte verhältnismäßig leicht wieder auswaschen. Sowohl diffus gefärbte Zellen als auch Krümel- oder Tröpfchenspeicherung konnten in Leitungswasser wieder entfärbt werden. Für die Festigkeit der Bindung des Rhodamins B an die Zelle erwies sich die Art der in der Vakuole enthaltenen Speicherstoffe als maßgebend. So läßt sich, wie schon Waldheim (1949) beobachten konnte, die Krümelspeicherung in gerbstoffhaltigen Zellen nicht mehr auswaschen.

Durch Chrysoidin gefärbte Zellen konnten durch längeres Liegen in der ungefärbten Pufferlösung vielfach wieder entfärbt werden, zumindest wurde die Intensität der Färbung bedeutend geschwächt.

Neutralrot ließ sich nur aus leeren Zellsäften wieder auswaschen, bei vollen Zellsäften konnte keine Entfärbung beobachtet werden.

Brillantkresylblau und Toluidinblau ließen sich weder aus vollen noch aus leeren Zellsäften wieder auswaschen.

Die Färbung des Protoplasmas mit Rhodamin B oder mit Chrysoidin konnte durch längeres Liegen der Zellen in Leitungswasser oder in der ungefärbten Pufferlösung stark geschwächt oder ausgewaschen werden.

Diese Ergebnisse lassen einen auffallenden Zusammenhang zwischen der Auswaschbarkeit des Farbstoffes aus vitalgefärbten Zellen einerseits und der Dissoziationskonstanten des Farbstoffes andererseits erkennen.

Farbstoffe mit hoher (Basen-) Dissoziationskonstante und hoch in der pH-Skala gelegentlichem Umschlagsbereich, wie z. B. Brillantkresylblau oder Toluidinblau, gehen festere Bindungen ein und lassen sich aus gefärbten Zellen nicht mehr auswachen. Schwer ionisierbare Farbstoffe, wie z. B. Rhodamin B oder Chrysoidin, deren Umschlagspunkt also im sauren Bereich liegt, lassen sich aus gefärbten Zellen verhältnismäßig leicht wieder auswaschen.

Neutralrot hat seinen Umschlagsbereich um den Neutralpunkt und liegt bei pH 7,4 zur Hälfte in ionisierter, zur anderen Hälfte in molekularer Form vor. Es nimmt somit eine Zwischenstellung zwischen den beiden erstgenannten Farbstofftypen ein. Neutralrot läßt sich daher nur aus leeren Zellsäften wieder auswaschen, in vollen Zellsäften konnte keine Entfärbung beobachtet werden.

Die Festigkeit der Bindung eines basischen Farbstoffes an zelleigene Stoffe scheint also parallel zu gehen mit dessen größerer oder geringerer Neigung, in wäßriger Lösung Ionen zu bilden.

Literatur

- Czaja, A. Th., 1954: Untersuchungen über metachromatische Färbungen von Pflanzengewebe II, Basische Farbstoffe. *Planta* 21, 531.
— 1956: Untersuchungen über den Membraneffekt der Adsorptionsgewebe und über die Farbstoffaufnahme in die lebende pflanzliche Zelle. *Planta* 26, 90.
Dangeard, P., 1947: *Cytologie végétale et cytologie générale*. Paris.
Diskus, A., und O. Kiermayer, 1954: Die Raphidenzellen von *Haemaria discolor* bei Vitalfärbung. *Protoplasma* 43, 450.

- Drawert, H., 1938: Über die Aufnahme und Speicherung von *Prune pure* durch die pflanzliche Zelle. *Planta* 29, 179.
- 1938 b: Beiträge zur Entstehung der Vakuolenkontraktion nach Vitalfärbung mit Neutralrot. *Ber. dtsch. bot. Ges.* 56, 123.
- 1939: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. I. Versuche mit Rhodaminen. *Planta* 29, 376.
- 1940: Desgl. II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. *Flora* 134, 159.
- 1941: Desgl. III. Die Aufnahme saurer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. *Flora* 135, 21.
- 1948: V. Zur Theorie der Aufnahme basischer Stoffe. *Z. Naturforsch.* 3 b, 111.
- 1951: Beiträge zur Vitalfärbung pflanzlicher Zellen. *Protoplasma* 40, 85.
- Flasch, A., 1955: Die Wirkung von Coffein auf vitalgefärbte Pflanzenzellen. *Protoplasma* 44, 412.
- und H. Kinzel, 1954: Rasche Bildung von Entmischungskörpern in Zellsäften von *Buxus sempervirens*. *Protoplasma* 44, 266.
- Guilliermond, A., 1902: Recherches cytologiques sur les levures et quelques moisissures à formes levures. Lyon.
- and L. R. Atkinson, 1941: The Cytoplasm of the Plant Cell. Waltham, Mass., USA.
- et R. Gautheret, 1958 a: Culture de *Saprolegnia diclina* en milieux additionnés de colorants. *C. r. Soc. Biol.* 128, 493.
- — 1958 b: Observations sur l'action de divers colorants sur les cellules végétales vivantes. *C. r. Acad. Sc. Paris* 206, 1517.
- Härtel, O., 1951: Gerbstoffe als Ursache „voller“ Zellsäfte. *Protoplasma* 40, 338.
- 1952: Das Verhalten des „festen Zellsaftes“ von *Cerithe* bei Fluorochromierung mit Akridinorange. *Protoplasma* 42, 83.
- 1953: Fluoreszenzmikroskopische und mikrochemische Beobachtungen an *Cirsium arvense*. *Mikroskopie* 8, 41.
- Hirn, I., 1953 a: Vitalfärbungsstudien an Desmidiaceen. *Flora* 140, 453.
- 1953 b: Vitalfärbung von Diatomeen mit basischen Farbstoffen. *S.ber. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl., I. Abt.* 162, 571.
- Höfler, K., 1947 a: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasma-permeabilität und Stoffspeicherung? *Mikroskopie* 2, 13.
- 1947 b: Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange. *S.ber. Österr. Akad. Wiss., math.-naturw. Kl., Abt. I.* 156, 585.
- 1948: Neue Ergebnisse der Vital- und Fluoreszenzfärbung. *Wiss. Mitt. Pharm. Forsch. Inst. österr. Ap.-Ver.* 1, 23.
- 1949 a: Fluorochromierungsstudien an Pflanzenzellen. Beiträge zur Fluoreszenzmikroskopie 1. Sonderband Mikroskopie, Wien.
- 1949 b: Fluoreszenzmikroskopie und Zellphysiologie. *Biol. gen. (I.; Ö.)* 19, 90.
- und H. Schindler, 1951: Vitalfärbung von Algenzellen mit Toluidinblaulösungen gestufter Wasserstoffionenkonzentration. *Protoplasma* 40, 137.
- — 1953: Vitalfärbbarkeit verschiedener Closterien. *Protoplasma* 42, 296.
- — 1955: Volle und leere Zellsäfte bei Algen. *Protoplasma* 45, 173.
- Hofmeister, L., 1948: Vitalfärbungsstudien mit Chrysoidin. *S.ber. Österr. Akad. Wiss., math.-naturw. Kl., Abt. I.* 157, Bd. 53.
- Irwin, M., 1923: The penetration of dyes as influenced by hydrogen ion concentration. *J. gen. Physiol. (Am.)* 5, 727.
- 1926: Mechanism of the accumulation of dye in *Nitella* on the basis of the entrance of the dye as undissociated molecules. *J. gen. Physiol. (Am.)* 9, 561.

- Kinzel, H., 1954: Theoretische Betrachtungen zur Ionenspeicherung basischer Farbstoffe in leeren Zellsäften. *Protoplasma* 44, 52.
- 1955: Ein einfaches Mikrokolorimeter. *Protoplasma* 45, 280.
- Kropfitsch, M., 1951: Apfelfas-Wirkung auf Stomatanzahl. *Protoplasma* 40, 256.
- Lanz, I., 1956: Über die Wirkung des Chrysoidins auf den Zellkern. *Z. Mikrosk.* 55, 387.
- Pfeffer, W., 1886: Über Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen. *Unters. Bot. Inst. Tübingen* 2, 179.
- Porzer, W., 1952: Vitalfärbungsstudie an Lebermoosen mit basischen Hellfeldfarbstoffen. *Phyton IV*, 205.
- Ruhland, W., 1912: Studien über die Aufnahme von Kolloiden durch die pflanzliche Plasmahaut. *Jb. wiss. Bot.* 51, 376.
- Schaede, R., 1925: Über das Verhalten von Pflanzenzellen gegenüber Anilinfarbstoffen. *Jb. wiss. Bot.* 62, 65.
- 1924: Untersuchungen über Zelle, Kern und ihre Teilungen am lebenden Objekt. *Beitr. Biol. Pfl.* 14, 231.
- Scheidt, W., 1955: Vakuolenkontraktion bei vollen Zellsäften an Zwiebelzellen von *Tulipa silvestris* und *Colchicum speciosum*. *Protoplasma* 44, 556.
- Strugger, S., 1956 a: Beiträge zur Analyse der Vitalfärbung mit Neutralrot. *Protoplasma* 26, 56.
- 1956 b: Die Vitalfärbung der Chloroplasten von *Helodea* mit Rhodaminen. *Flora* 151, 115.
- 1957: Weitere Untersuchungen der Chloroplasten mit Rhodaminen. *Flora* 151, 115, 524.
- 1958: Die Vitalfärbung des Protoplasmas mit Rhodamin B und 6 G. *Protoplasma* 50, 85.
- 1940: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. *Jena. Z. Naturw.* 73, 97.
- 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl. Berlin.
- De Vries, H., 1871: Sur la perméabilité du protoplasme des betteraves rouges. *Arch. Néerland.* 6, 117 (*Opera collata* 1, 86).
- Waldheim, W., 1949: Differentialfärbung mit Rhodamin B. Darstellung der Gerbstoffzellen im *Carex*-Blatt. *Mikroskopie* 4, 46.
- 1955: Vitalfärbestudien mit Rhodamin B. Dissertation Wien.
- Weber, F., 1945: Spaltöffnungsanomalien colchiciniertes *Tradescantia*-Blätter. *Protoplasma* 37, 556.
- Wiesner, G., 1950: Untersuchungen über Vitalfärbung von *Allium*-Zellen mit basischen Hellfeldfarbstoffen. *Protoplasma* 40, 405.
- Wisselingh, C. van, 1915: Über den Nachweis des Gerbstoffes in der Pflanze und über seine physiologische Bedeutung. *Beih. Bot. Zbl.* 32, 155.
- Wulff, H. D., 1934: Lebendfärbung mit Chrysoidin. *Planta* 22, 70.

Zerfall homogener *Epiphyllum*-Eiweißspindeln in Fibrillen

Von

Liselotte Reiter

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz

Mit 5 Textabbildungen

(Eingelangt am 8. April 1955)

Die von Molisch (1885) entdeckten Eiweißspindeln in den Epidermiszellen von *Epiphyllum truncatum* wurden anfänglich für Reservestoffe gehalten. Schon Chmielewsky (1887) hat ihre Reservestoffnatur bezweifelt. Nach neueren Untersuchungen werden die Eiweißspindeln dieser und anderer Kakteen als Viruseinschlußkörper angesehen (Rosenzopf 1951, Weber u. Kenda 1952, Weber 1953 u. a.).

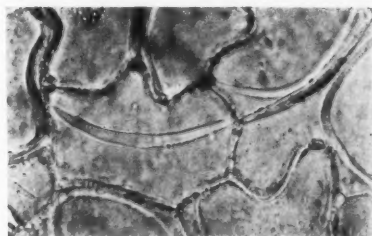


Abb. 1. *Epiphyllum truncatum*, Epidermiszelle mit homogener Eiweißspindel.



Abb. 2. *Epiphyllum truncatum*, Epidermiszelle nach Alkoholbehandlung. Eiweißspindeln mit fibrillär zopfiger Struktur.

Die Eiweißspindeln von *Epiphyllum* haben in der Regel ein homogenes Aussehen, können aber auch schon *in vivo* eine mehr oder weniger deutliche faserige Struktur erkennen lassen (Mikosch 1890, 1908). Küster (1951, 437) bezeichnet sie daher als „Eiweißfibrillenbündel“.

In den folgenden Versuchen wird der Einfluß von Alkohol auf die Eiweißspindeln von *Epiphyllum* untersucht. Es wurden nur Epidermis-

schnitte verwendet, die Eiweißspindeln mit mikroskopisch homogener (Abb. 1), also nicht fibrillärer Struktur enthielten. Läßt man 96%igen



Abb. 3. *Epiphyllum truncatum*, Epidermiszelle. Eiweißspindeln nach Alkoholbehandlung an beiden Enden zerfranst.

Alkohol zu den unter dem Deckglas in Wasser liegenden Schnitten eindringen, so kann man nach ungefähr 2 Minuten eine Veränderung der Eiweißspindeln direkt beobachten. Sie verlieren allmählich ihr homogenes Aussehen und zerfallen in zahlreiche Fibrillen. Diese Fasern verlaufen nicht parallel zueinander, sondern die nun deutlich sichtbaren Fibrillen sind zopfartig ineinander verflochten (Abb. 2). An beiden Enden weichen die Fasern oft büschelförmig auseinander. Es sei daran erinnert, daß Weber und Kenda (1951) in *Rhipsalis cereuscula* Eiweißspindeln mit zopföfger Struktur gesehen haben. Sie vermuteten, daß die Spindeln aus mehreren tordierten und verflochtenen Fibrillen sich zusammensetzen. Durch die oben beschriebene, mit Alkohol erzielte Strukturänderung findet diese Vermutung ihre Bestätigung. Abb. 3 zeigt Spindeln, deren eine Hälfte noch homogen erscheint, deren andere

Hälfte aber schon infolge der Alkoholeinwirkung zerfranst ist. Bei längerer Alkoholeinwirkung (15 bis 30 Minuten) entflechten sich die Fibrillen vollkommen und liegen dann nur mehr als einzelne, isolierte Fäden in der Zelle. Handelt es sich um große, ansehnliche Eiweißspindeln, so können die so isolierten Fibrillen fast die ganze Zelle ausfüllen (Abb. 4). Man darf wohl annehmen, daß durch den Alkohol die „Zwischensubstanz“, die die Fibrillen *in vivo* zusammenkittet, herausgelöst und so die Isolierung ermöglicht wird. Die Natur der verbindenden Zwischensubstanz ist unbekannt. Wirkt der Alkohol auf die Fibrillen längere Zeit ein, so gehen auch diese in Lösung. Im übrigen scheinen nicht alle Eiweißspindeln gleich leicht und gleich schnell in Fibrillen zu zerfallen. Einige Spindeln verändern sich nach Alkoholzusatz sehr schnell, andere dagegen scheinen gegenüber Alkohol in höherem Grade resistent zu sein. Oft verschwinden die Spindeln schon gänzlich, bevor noch die Verflechtung der Fibrillen gelöst wird. Behandelt man Epi-

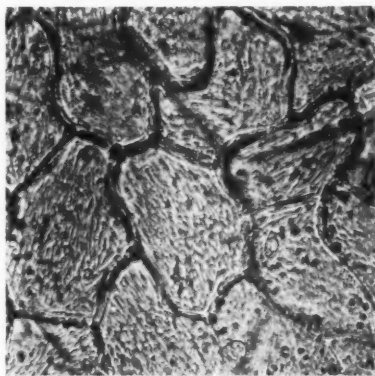


Abb. 4. *Epiphyllum truncatum*, Epidermiszelle nach längerer Alkoholeinwirkung. Die Fibrillen, in welche die Eiweißspindeln zerfallen, füllen die ganze Zelle aus.

dermisschnitte, in denen die Spindeln durch den Alkohol bereits die fibrillär verflochtene Struktur zeigen, nach der Säurefuchsinmethode (Zimmernann 1892), so färben sich die einzelnen Fibrillen intensiv rot (Abb. 5). Dies zeigt, daß die Rotfärbung mit Säurefuchsin, wie sie auch die homogenen Spindeln zeigen, auf die Färbung der Eiweißfibrillen zurückgeht und an ihr die Kittsubstanz nicht beteiligt ist.

Vorsichtiges Kochen der Schnitte in Wasser kann zu einer Kontraktion der Eiweißspindeln führen. In diesem Zustande zerfallen dann die Spindeln unter Alkoholeinfluß nicht mehr in Fibrillen. Die Kittsubstanz dürfte dabei durch das Kochen in Wasser die Alkohollöslichkeit verloren haben.

Nach Abschluß dieser Untersuchungen wurde mir eine Arbeit von Amelunxen (1955) bekannt, in der der Zerfall der Eiweißspindeln unter dem Einfluß quellend wirkender Substanzen beschrieben wird.

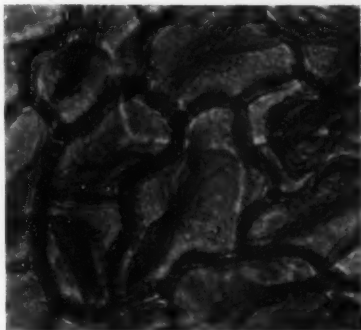


Abb. 5. *Epiphyllum truncatum*, Epidermiszelle, die einzelnen Fibrillen der aufgefrachten Eiweißspindeln mit Säurefuchsin gefärbt.

Literatur

- Amelunxen, F., 1955: Über die Strukturanalyse der Eiweißspindeln der Kakteen. *Protoplasma* 45.
 Kenda, G., 1954: Eiweißspindeln in *Opuntia monacantha* f. *variegata*. *Protoplasma* 44.
 Küster, E., 1951: Die Pflanzenzelle, 2. Aufl. Jena
 Mikosch, C., 1890: Über ein neues Vorkommen geformten Eiweißes. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 8, 55.
 — 1908: Über den Einfluß des Reises auf die Unterlage. In *Linsbauer: Wiesner-Festschrift*. Wien.
 Molisch, H., 1885: Über merkwürdig geformte Proteinkörper in den Zweigen von *Epiphyllum*. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 5, 195.
 Rosenzopf, E., 1951: Sind Eiweißspindeln Viruseinschlußkörper? *Phyton* 3, 102.
 Weber, F., und G. Kenda, 1952: Cactaceen-Virus-Eiweißspindeln. *Protoplasma* 41.
 — 1955: Viruskrankes *Epiphyllum*. *Öst. bot. Z.* 100.

Sammelreferate

Der Stand des Metachromasieproblems¹

Von

Dr. H. Woohsmann

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Rostock, DDR

Mit 5 Textabbildungen

(Eingelangt am 20. Mai 1955)

Unter der Metachromasie versteht man die Erscheinung, daß ein Farbstoff bestimmte Substanzen nicht in seinem normalen (orthochromatischen), sondern in einem abweichenden (metachromatischen) Farbton anfärbt. Dieses Phänomen ist schon früher Gegenstand zahlreicher Untersuchungen und ganz besonders auch spektroskopischer Beobachtungen *in vitro* gewesen, da diese Färbungen zwei biologisch wichtige Stoffklassen betreffen, nämlich die Mucopolysaccharide und die Nucleinsäuren. Auf Grund ihrer metachromatischen Färbbarkeit werden diese Stoffe auch als *chromotrope* Substanzen bezeichnet. Die Metachromasie wird in sehr vielen Fällen durch basische Farbstoffe erzeugt, die in der Zellphysiologie und auch Histologie eine große Bedeutung erlangt haben. Daraus hat sich eine Reihe von Problemen ergeben. Die metachromatisch wirkenden basischen Farbstoffe, die vielfach zur Messung der Wasserstoffionenkonzentration herangezogen werden, da sie Indikatoren sind, sollen durch die in der Zelle verbreitet vorkommenden chromotropen Substanzen abgefangen werden, so daß der sogenannte „*erreur métachromatique*“ auftritt [1]. Diese Indikatoren gehen also eine Bindung mit den genannten Stoffen ein, und sie zeigen dann nicht eine pH-Änderung an, sondern der Umschlag beruht auf einem Vorgang besonderer Art. Ein weiteres Problem ist der Farbumschlag selber oder auch die Frage, welche Substanzen eigentlich dadurch nachgewiesen werden.

¹ Die Probleme der Metachromasie haben sich in den letzten Jahren so weiterentwickelt, daß eine baldige prinzipielle Lösung zu erwarten ist. Das vorliegende Sammelreferat soll nur über den augenblicklichen Stand dieser Entwicklung informieren. Wenn dann ein gewisser Abschluß dieser Gestaltung der Probleme erfolgt ist, wird es an der Zeit sein, wieder ein umfassendes Referat über die ganze historische Entwicklung der Metachromasie zu bringen. Heute wäre dies noch verfrüht und ist in dem vorliegenden kurzen Referat auch nicht beabsichtigt. Vom Autor selbst wird demnächst auch eine größere experimentelle Arbeit auf diesem Gebiet erscheinen.

Die Redaktion, Spe k.

Es ist nämlich sehr wahrscheinlich, daß die metachromatische Färbung auf einer bestimmten Molekularstruktur beruht, wie weiter unten ausgeführt werden wird, und daß alle Substanzen, die eben diese Struktur aufweisen, auch diese eigentümliche Reaktion geben.

In neuerer Zeit sind zu diesen Fragen zahlreiche Arbeiten erschienen, von denen leider einige mit sehr interessanten Ergebnissen infolge des Krieges zu wenig Beachtung gefunden haben, so daß an dieser Stelle einmal kurz die verschiedenen Theorien der metachromatischen Färbung sowie die Abgrenzung der letzteren gegen die Vitalfärbung und zuletzt ganz neue Perspektiven, die sich teils aus Versuchen an Zellmaterial, teils aus ganz neuen chemischen Arbeiten ergeben haben, erörtert werden sollen.

Wenn wir zunächst die Ergebnisse der photometrischen Untersuchungen der verschiedenen Autoren an den wäßrigen Lösungen metachromatischer Farbstoffe betrachten, so fallen sofort weitreichende Unterschiede ins Auge. Während Lison [1-4] lauter Absorptionskurven publiziert, die einigipfelig sind, fanden Bank und Bungenberg de Jong [5] sowie Spek [6, 7] und andere, daß zum Beispiel eine Toluidinblaulösung, die im Reagenzglas hellblau erscheint, mit dem Handspektroskop zwei Banden erkennen läßt. Die eine Bande liegt bei 580-600 $m\mu$, die andere bei 635 bis 650 $m\mu$. Auch Michaelis [8, 9] hat diese Kurve zweigipfelig gezeichnet. Wenn man diese Toluidinblaulösung in einem Reagenzglase vorsichtig mit destilliertem Wasser überschichtet, erhält man ein Konzentrationsgefälle. Mit einem Handspektroskop kann man nun von der geringsten bis zur stärksten Konzentration wandern und das sich verändernde Spektrum beobachten. In starker Verdünnung, bei der die Farblösung blaßgrün erscheint, verschwindet die bei 580-600 $m\mu$ gelegene Bande vollständig, während die andere, bei 635-650 $m\mu$ (α -Bande der amerikanischen Autoren) gelegene, gut sichtbar bleibt. Geht man nun in stärkere Konzentrationen hinunter, dann erscheint die zweite Bande (β -Bande der amerikanischen Autoren). In der Konzentration von 1:20.000 sind beide nebeneinander sichtbar. In noch höheren Konzentrationen verstärken und verbreitern sich beide Banden, und die zweite Bande (β -Bande) wird bei genügender Durchleuchtung unzweifelhaft dunkler als die Bande in Rot. Die beiden Banden nehmen also bei steigender Konzentration nicht gleichmäßig zu. Wenn der Farbstoff zwei Modifikationen enthalten soll, so müßten bei gleichbleibendem Mengenverhältnis derselben und steigender Gesamtkonzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz beide Banden in gleichem Maße stärker werden. Geschieht das nicht, so verschieben sich die metachromatische und die normale Modifikation gegeneinander, oder aber eine Bande rührt von einer ganz anderen optischen Erscheinung her. Das ist hier offenbar der Fall.

Sheppard und Geddes [10] führen diese Erscheinung auf die Bildung von planparallelen Molekülen und Ionen bei starker Konzentration zurück. Farbstoff und Substrat sollen zunächst einmal polar verkettet sein, und die Stärke der polaren Bindung hängt von dem pH der Lösung ab. Die planparallelen Moleküle liegen getrennt in einem Abstand von ca. 4 Å geldrollenartig übereinander und sollen für die Abweichung vom Lambert-Beerschen Gesetz verantwortlich sein. Van der Waalsche Kräfte, die zwischen den parallelen Ringen wirken, führen zur Bildung von Polymeren, die durch eine Temperaturerhöhung zerstört werden und beim Abkühlen sich wieder neu bilden.

Spek [6] konnte dagegen feststellen, daß die bei 635–650 m μ gelegene Bande die des fluoreszenzerregenden Lichtes ist. Die Wellenlänge wurde mit einem Monochromator genauer bestimmt. Die rote Fluoreszenz des Toluidinblaus wird ganz besonders stark in einem Licht von Wellenlängen um 645 m μ . Die zuerst erscheinende Absorptionsbande des Toluidinblaus liegt aber bei 635–650 m μ . Es handelt sich also mit Sicherheit um die Bande des fluoreszenzerregenden Lichtes. Die meisten metachromatischen Farbstoffe fluoreszieren nämlich. In verdünnter Lösung ist die Fluoreszenz relativ viel stärker ausgeprägt als in konzentrierter, daher ist auch in sehr verdünnten Lösungen die Bande des fluoreszenzerregenden Lichtes so gut sichtbar. Mit steigender Konzentration nimmt die Fluoreszenz

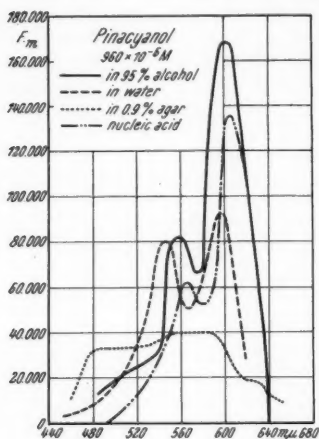


Abb. 1. (Aus Michaelis 1950.)

eine distinkte β -Bande. In höheren Konzentrationen wird der Farbstoff stark viskös, und es erscheint im Spektrum die sogenannte α -Bande (in Abb. 1 dargestellt durch Bindung an Agar). Wenn der Farbstoff in noch höheren Konzentrationen die Eigenschaft einer Kristalllösung erhält, kommt noch eine neue scharfe Bande am roten Ende des Spektrums zustande, welche der Resonanzfluoreszenz zugeschrieben wird. Bei der Polymerisationstheorie werden die Untersuchungen Scheibes verallgemeinert. Die erste Bande soll die monomere Form, die zweite (β -Bande) die dimere und die α -Bande die polymerisierte Form des Farbstoffs verdeutlichen. Die Verschiebung der Maxima soll der Ausdruck der zunehmenden Polymerisation sein, da sich ja auch schon bei photometrischen Messungen verschieden starker Farblösungen das Maximum der konzentrierteren mehr nach dem kurzwelligen Ende verschiebt. Auf die metachromatischen Farbstoffe ist das aber nicht ohne weiteres übertragbar, denn sie zeigen in starken Konzentrationen keine viskose Beschaffenheit, wenn auch eine Dimerisation oder sogar eine Polymerisation auftreten mag. Die violette Farbe einer konzentrierten Toluidinblaulösung kann man auch darauf zurückführen, daß einfach viel undissoziiertes Farbsalz in Form von Farbsalzmolekülen in der Lösung vorhanden ist. Die Verschiebung der Banden kann man auch ganz anders und meines Erachtens viel einleuchtender erklären.

nicht proportional zu, sondern ihre Bande bleibt hinter der jetzt auftretenden Bande des ionisierten Farbsalzes zurück. Diese Erscheinung, die erklärt, warum die Banden vieler Farbstoffe nicht dem Beerschen Gesetz gehorchen, wurde von allen anderen Autoren übersehen, die das Verhalten dieser beiden Banden in ganz anderem Sinne deuteten.

Die schon oben angeführte Bildung von planparallelen Molekülen und die Auslegung der zuerst erscheinenden Bande als zum monomeren Farbstoff gehörig, der zweiten als der des dimeren oder polymerisierten Farbstoffs, führte zur Polymerisationstheorie. Hier stützen sich fast alle Autoren hauptsächlich auf die Arbeiten von Scheibe [11] an polymethinen Farbstoffen, wie z. B. Pinacyanol. In verdünnter wässriger Lösung und in Alkohol zeigt sich eine hohe α -Bande und

Die sogenannte α -Bande ist die Bande des fluoreszenzerregenden Lichtes. (In Alkohol wird die Fluoreszenz noch verstärkt, so daß die Kurve dieser Bande noch spitzer werden kann.) Die zweite oder β -Bande verbildlicht das ionisierte Farbsalz in der Lösung. Mit steigender Konzentration wird ja den Farbionen immer mehr Lösungsmittel entzogen, so daß sie laufend in das undissoziierte Farbsalzmolekül umgewandelt werden müssen. So nähert sich bei steigender Konzentration die Bande der Farbionen (β -Bande) immer mehr den kürzeren Wellenlängen und erreicht ein Maximum bei ungefähr $540\text{ m}\mu$. Dieses Maximum erhält man aber auch von dem ausgesalzenen Farbstoff. Nach dem Massenwirkungsgesetz geht folgendes in der Farblösung vor:

$$\frac{\text{Farbkationen} \times \text{Farbanionen}}{\text{undissoziiertes Farbsalz}} = K.$$

Durch das Zurückdrängen der Dissoziation der Farbionen wird die Konzentration erhöht, und das undissoziierte Farbsalz muß zunehmen. Das Auftreten der Banden kann man also auch so interpretieren: In ganz verdünnten Lösungen ist die Bande des dissoziierten Farbsalzes ganz schwach oder gar nicht sichtbar. In diesen verdünnten Lösungen ist aber die Fluoreszenz im Verhältnis dazu stark ausgeprägt. Es tritt also zunächst die Bande des fluoreszenzerregenden Lichtes auf, die bei stärkeren Konzentrationen durch die Konzentrationslöschung verschwindet. Bei steigender Konzentration wird die Bande der Farbionen (β -Bande) sichtbar. Es wird laufend mehr Farbsalz gebildet, und sie wandert weiter nach der kürzeren Wellenlänge. Die Wanderung in Richtung des Maximums der Farbsalzes drückt eben aus, daß immer mehr undissoziiertes Farbsalz entsteht.

Eine Toluidinblaulösung ist in ganz schwacher Konzentration blau bis grün. Die dazugehörige Bande $640\text{ m}\mu$ liegt im Komplementärfarbtönen Orange bis Rot des kontinuierlichen Spektrums und hat einen hohen Extinktionswert. In stärkerer Konzentration überwiegt der Farbton der Farbionen Blau bis Violett. Die betreffende Bande liegt bei $590\text{ m}\mu$ im Komplementärfarbtönen Gelb des Spektrums. Die Konzentration der Farblösung ist größer geworden, darum sinkt auch der Extinktionswert. Bei weiter steigender Konzentration entsteht mehr und mehr rotes undissoziiertes Farbsalz, und die photometrisch gemessene Bande schiebt sich in den grünen Bereich des Spektrums.

Aus diesen Tatsachen kann keinesfalls auf eine Polymerisation des Farbstoffs geschlossen werden, denn gerade dann müßte umgekehrt eine Rot-

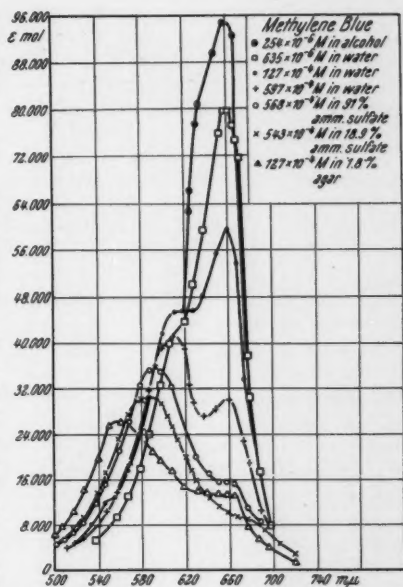


Abb. 2. (Aus Michaelis 1952.)

verschiebung der Banden auftreten, weil polymerisierte Moleküle langsamer schwingen. Nun kann man aber die Rotverschiebung photometrisch in diesem Falle kaum messen, weil es einfach nicht möglich ist, eine gleich stark konzentrierte unpolymersierte Lösung dagegenzuhalten. Es besteht nur die Möglichkeit, die Polymerisation auf andere Weise zu messen oder den Farbstoff für sich allein, und dann, vergleichsweise an ein Medium gebunden, zu photometrieren. Dann allerdings tritt eine Rotverschiebung auf, denn an einem Medium, wie z. B. Agar, soll eine verstärkte Polymerisation auftreten. Spek schließt die schwerlösliche Base von Toluidinblau in Wasserglas ein, um für photometrische Zwecke eine möglichst gleichförmige und feindisperse Suspension von der schwerlöslichen Farbbase zu erhalten und findet dabei eine beträchtliche Rotverschiebung. Diese könnte auch auf einem Polymerisationsvorgang oder auf einem besonderen Bindungsmodus beruhen. Das letztere ist viel wahrscheinlicher, wie weiter unten noch erläutert werden wird. In Abb. 2 ist für Methylenblau das Absinken der β -Bande bei zunehmender Konzentration dargestellt. Neben dem durch Ammonsulfat gefällten Farbsalz sind noch Farbionen in der photometrierten Lösung vorhanden, so daß die Agarbande nicht ganz erreicht wird. Wir werden sehen, daß nach experimentellen Befunden angenommen werden muß, daß das Farbsalzmolekül in die chromotropen Substanzen eingebaut wird. Das Farbsalzmolekül ist also die Ursache des metachromatischen Farbtons. Das Farbsalz von Toluidinblau ist in undissoziiertem Zustande rot, chromotrope Substanzen werden rot gefärbt, das Farbsalzmolekül von Neutralrot ist orange, der metachromatische Farbton ist orange usw.

Bei dieser Auffassung ist es auch gar nicht nötig, zwei Typen der Metachromasie anzunehmen. Nach Michaelis wird die Metachromasie, die auf der Aussalzung des Farbstoffs beruht, abgetrennt von der gewöhnlichen Polymerisationsmetachromasie [12].

Ein gleiches oder sehr ähnliches Maximum wie das des Farbsalzes erhält man auch durch Zugabe von Natronlauge zum Farbstoff. Es entsteht die Farbbase. Die des Toluidinblaus ist in Wasser schwer löslich. In einem Puffergemisch von pH 7,5 erfolgt kein Umschlag. Es scheidet sich nur etwas Farbbase in feiner Dispersität aus und sinkt zu Boden. Wenn das pH steigt, wird mehr Farbsalz in die Farbbase umgebildet. Hier ist also ein zweites Gleichgewicht vorhanden. Von Wichtigkeit ist für uns zunächst nur, daß beim Auftreten der μ - oder metachromatischen Bande theoretisch auch die Farbbase vorliegen kann.

Wenn man nun chromotrope Substanzen, die mit metachromatischen Farbstoffen gefärbt sind, photometriert, dann erhält man immer gleichartige Kurven. Recht auffällig ist, daß außer den Mucopolysacchariden auch die metachromatisch gefärbten Nucleinsäuren ein gleiches Spektrum aufweisen. Wenn überhaupt aus dem Spektrum auf einen Bindungsmodus geschlossen werden kann, so ist bei dem gleichartigen Kurvenverlauf auch auf eine gleichartige Bindungsweise zu schließen. Benazzzi-Lentati 1943 [13] konnte nachweisen, daß auch cytoplasmatische Strukturen, die Ribonucleinsäuren enthalten, metachromatisch gefärbt werden. Ist das Farbstoffangebot groß, ist die Färbung metachromatisch; ist die Konzentration der Farblösung gering, ist sie z. B. mit Toluidinblau blau bis grün. Lison und Mutsaers [4] untersuchten die Ribonucleinsäure und die Desoxyribonucleinsäure spektroskopisch bei Farbstoffzugabe *in vitro* (Abb. 3). Wenn dem Natriumsalz der DRS oder RNS eine $m/20.000$ Lösung von Toluidinblau zugefügt wird, wird der Farbton mehr und mehr rot. Ist die

Konzentration der Nucleinsäuren über 2,5/100.000 angestiegen, wechselt der Farbton von Blau zu einem Blaugrün. Thionin wechselt von Violett zu Rötlich und dann zu einem reinen Blau. Dieser Farbwechsel drückt sich auch im Spektrum aus. Ist der Farbton der NS-Thioninlösung rot, ist das Absorptionsspektrum ganz ähnlich, als wenn eine chromotrope Substanz in der Lösung vorhanden wäre. Wenn die Konzentration der NS weiter zunimmt, verschiebt sich diese metachromatische Bande nach den längeren Wellenlängen hin und steigt wieder auf. Jedoch kehrt sie nicht zu den Absorptions-

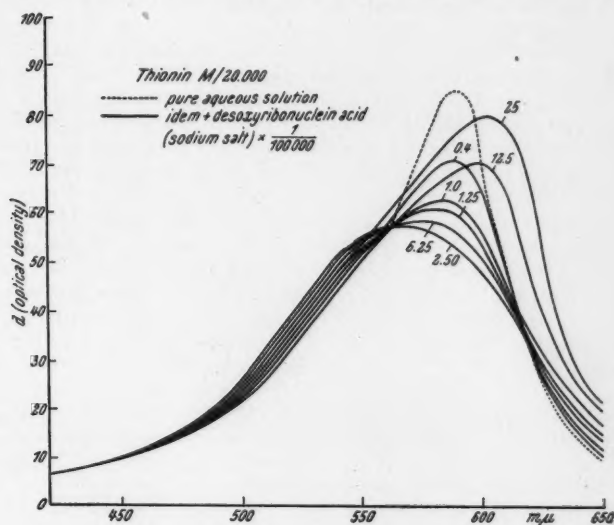


Abb. 3 (aus Lison u. Mutsaars 1950).

werten der reinen wässrigen oder alkoholischen Lösung zurück. Das Maximum der neuen Bande liegt bei 605 mμ. Diese Lage entspricht dem grünen Farbton der Lösung. Die Verschiebung nach der längeren Wellenlänge wird als Depolymerisierung gedeutet und auf die erhöhte Konzentration der NS zurückgeführt. Rein spektroskopisch gesehen zwingt diese Rotverschiebung doch hier zur Annahme einer Polymerisation. Auch Lison spricht seine Zweifel über diese Vermutung der Depolymerisierung aus und nimmt eher an, daß ein neuer Komplex mit anderen Eigenschaften gebildet wird. Alle metachromatischen Reaktionen zeichnen sich ja durch den sogenannten Temperatureffekt aus, d. h. beim Erhitzen des metachromatischen Komplexes wird derselbe gespalten (nach der Polymerisationstheorie depolymerisiert) und der rein orthochromatische Farbton der Farblösung erscheint, der beim Erkalten wieder in den metachromatischen umgewandelt wird. Dieses Phänomen findet man auch an den Ribonucleinsäure-Farbstoffkomplexen. Auch hier tritt beim Abkühlen entweder der metachromatische rote oder blaugüne Farbton auf, je nachdem, von welchem Komplex ausgegangen wurde. Die Verschiebung der Maxima nach den längeren Wellenlängen zeigt sich übrigens auch bei starken Konzentrationen von Mucopolysacchariden, wie Levine und Maxwell 1952 [14] zeigen konnten. Wird

die Konzentration laufend erhöht, wandert das Maximum von der kurzen zur langen Wellenlänge, und es zeigt sich das gleiche Bild wie an der Nucleinsäure. Durch das Anwachsen der Chondroitinsulfat-Konzentration soll die Anionendichte aus dem richtigen Verhältnis geschoben werden, und mit dem durchschnittlichen Größerwerden der Kationendichte verschwindet die Metachromasie (R a w s o n 1943, [15]). Die Regionen hoher Anionendichte sollen demnach den Farbstoff fixieren. L i s o n schlägt für beschreibende Zwecke vor, den Wechsel des Maximums nach der kurzen Wellenlänge im Vergleich mit der orthochromatischen Farblösung als „positive Metachromasie“ zu bezeichnen und die Änderung nach dem langen Wellenbereich als „negative Metachromasie“. Die NS ist positiv metachromatisch, wenn ihre eigene Konzentration gering ist und die Farblösung stark, und negativ metachromatisch, wenn die Nucleinsäure in starker Konzentration vorliegt.

Alle photometrischen Untersuchungen können uns zunächst nicht „mehr“ Aufschlüsse über die Natur der Komplexe und ihre Bildungsweise geben. Das Spektrum sagt aus, daß im Falle der positiven Metachromasie entweder das Farbsalz oder die Farbbase vorliegt. Bei der negativen Metachromasie entsteht ein anderer Komplex mit einem anderen (Toluidinblau) oder ein orthochromatischer Farbton, der von einer Rotverschiebung begleitet wird.

Wenden wir uns nun dem Komplex selber zu. Die Natur der metachromatischen Komplexe hat bisher nur S p e k [6, 7] genauer untersucht. Am besten kann man bei der Einwirkung von metachromatischen und nicht-metachromatischen Farbstoffen auf chromotrope Substanzen den Unterschied einer Komplexbildung von einer Adsorption studieren. In zwei Reagenzgläsern wird Agarpulver mit Wasser durch Erhitzen gelöst und nach dem Erstarren mit destilliertem Wasser überschichtet. Nach einigen Tagen löst sich etwas Agar in dem überstehenden Wasser. Läßt man wenige Tropfen einer 1 : 2000 verdünnten Lösung Toluidinblau in das eine Glas fallen und in das andere wenige Tropfen des nichtmetachromatischen Brillantkresylvioletts, so entstehen ganz verschiedene Bilder. Die Toluidinblautropfen erstarren in der Lösung und nehmen sofort einen roten Farbton an. Sie behalten ihre Form, und die darunterliegende Gallerte bleibt ungefärbt. Im zweiten Glase verteilt sich der Farbstoff (BCV) in der ganzen Lösung und diffundiert immer stärker in die Gallertmasse ein. Lösung und Gallerte sind orthochromatisch blau gefärbt. In der Agar-Toluidinblau-Lösung ist der Farbstoff quantitativ ausgefällt worden. S p e k nennt diese Reaktion daher auch „Fällungsmetachromasie“. Setzt man einer mit Natriumcitrat-Natronlauge auf pH 6 gepufferten Lösung von Chondroitinsulfat 0,1% Neutralrot zu, so nimmt der Farbstoff einen schmutzigen orangefarbenen Farbton an, der in der pH-Skala nicht recht unterzubringen ist. Die Farblösung hat sich beträchtlich getrübt. Vor der Nephelometerlampe erscheint ein gelblichgrüner Tyndallkegel. Die Trübung kommt durch das Entstehen feiner Häutchen und Fetzen zustande. Sie bilden eine Phasengrenze gegen die Farblösung und haben einen stark dehydrierten Charakter.

Stellt man sich ein Gemisch von Neutralrot und chromotroper Substanz her, bei dem die gesamte Farblösung den schmutzigen zinnoberroten Farbton zeigt, gießt die Mischung in eine Pergamenthülle von S c h l e i c h e r und S c h ö l l und hängt sie in destilliertes Wasser, dann stellt man fest, daß absolut kein molekular gelöster Farbstoff mehr hinausdiffundiert. Molekular gelöster Farbstoff ist offenbar in diesem Gemisch gar nicht mehr vorhanden. Der ganze Farbstoff ist in dem Komplex gebunden.

Diese Komplexe zeichnen sich durch eine starke Stabilität gegenüber

Säuren aus. So wird z. B. ein Komplex aus Agar-Thionin oder Agar-Viktoriblaue 4R selbst bei einem pH von 1 nicht zerstört. Das ergibt sich wohl daraus, daß der Farbstoff so in den Komplex eingebaut ist, daß die Mineralsäuren gar nicht an ihn herankönnen. S p e k benutzt daher auch zur Unterscheidung von einem Indikatorumschlag und einer metachromatischen Färbung mit basischen Indikatoren die leicht eindringende Kohlensäure. Durch einen Komplex von Agar-Neutralrot kann man stundenlang Kohlensäure hindurchleiten, ohne daß der Farbton nach Rosa umschlägt, wie es beim Vorliegen der Farbbase, d. h. bei einer einfachen Adsorptionsfärbung im alkalischen Farbton, ohne weiteres geschehen würde.

Von Wichtigkeit für unsere weiteren Ausführungen, ganz besonders für das Problem der Vitalfärbung mit metachromatischen Farbstoffen, ist auch folgender Versuch von S p e k: Setzt man einer Lösung Arabylschwefelsäure, die ungefähr ein pH von 4,2 hat, vorsichtig ganz verdünnte Neutralrotlösung zu, kommt es zunächst zu k e i n e r Komplexbildung, sondern der Farbstoff nimmt den Farbton des herrschenden pHs an, ist also rosa. Erst nach einer Steigerung der Farbstoffkonzentration tritt der metachromatische Farbton und die Komplexbildung auf. Der Farbstoff muß zur Komplexbildung eine gewisse Konzentration haben. L i s o n [1] hatte gefunden, daß bei Modellversuchen schon ganz geringe Farbstoffkonzentrationen einen Umschlag verursachen, und daraus gefolgert, daß der gleiche Farbwechsel in der Zelle unter den nämlichen Bedingungen zustande kommt. Färbungen chromotroper Substanzen an lebenden Amöben (S p e k [7]), Flagellaten und Ciliaten (diese Arbeit des Autors erscheint demnächst im „Protoplasma“) gelingen nur bei starken Farbstoffkonzentrationen, denn in der lebenden Zelle verhalten sich die chromotropen Stoffe den Farblösungen gegenüber ganz anders. Bei direkter Farbstoffeinwirkung konnte „in“ der lebenden Zelle weder mit Vital- noch mit stärkeren Konzentrationen eine metachromatische Färbung festgestellt werden. Das wird auch aus S p e k s Versuchen an der Amöbenmembran deutlich. Durch Anpusten mit einer Mikropipette war diese von außen, aber nicht vom Innern her mit starken Konzentrationen färbbar. Es sind also im Innern der Zelle besondere Faktoren vorhanden, die diese Reaktion der beiden Komponenten des Farbstoffes und der chromotropen Substanz verhindern. Einer dieser Störfaktoren ist m. E. die in der Zelle behinderte Quellung der Mucopolysaccharide. Werden Hüllmembranen von Colpidien oder Trichocysten der Ciliaten metachromatisch gefärbt, so macht man die Beobachtung, daß der Farbstoff sich zwar blitzartig mit der chromotropen Substanz verbindet, aber erst nachdem durch starke Wasseraufnahme die Hüllsubstanz aufgequollen ist. Dann erst ist es dem Farbstoff möglich einzudringen, wobei ein großer Teil des Quellungswassers wieder herausgetrieben wird. Die metachromatischen Komplexe sind nämlich sehr wasserarm, und an Stelle des Wassers sitzt nun der Farbstoff selber in der Verbindung. In der Zelle findet dieser Quellungsvorgang nicht statt (Colpidienhüllen können bis zur fünffachen Größe des Individuums aufquellen), es ist also nicht genügend Platz zur Einlagerung des Farbstoffs vorhanden, und es kommt nur eine orthochromatische Adsorptionsfärbung zustande, die auch bei chromotropen Stoffen ohne weiteres möglich ist, wie schon S p e k bei der orthochromatischen Färbung nicht ausgequollenen Agargels mit Toluidinblau zeigen konnte. An Hand zahlreicher weiterer Versuche konnte S p e k immer wieder nachweisen, daß mit Vitalkonzentrationen keine metachromatischen Reaktionen erzielt werden können. Er färbte Gewebe, wie z. B. Knorpellamellen, die

schon von vornherein große Mengen von chromotropen Substanzen enthalten, vital mit basischen Farbstoffen an; zum andern machte Speck mit Hilfe von Mikromanipulator und Mikropipetten Injektionen von Lösungen chromotroper Substanzen in Zellen, welche mit metachromatischen Farbstoffen vital gefärbt wurden. In keinem Falle kam mit den verdünnten Farblösungen eine metachromatische Reaktion zustande. Wohl färbten sich Substanzen im Farbton der alkalischen Seite, doch durch Einleiten von Kohlensäure oder Einlegen dieser Objekte in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer, $\text{pH} = 4,62$, konnten diese Umschläge rückgängig gemacht werden. Auch bei meinen Versuchen an freilebenden Flagellaten und besonders Flagellatenkolonien wurde eine Komplexbildung nur mit stärkeren Konzentrationen erzielt. Die an Protozoen beobachteten metachromatischen Färbungen treten erst bei 1 : 50.000 und stärkeren Farblösungen auf, und es läßt sich daraus die allgemeine Regel ableiten, daß die Metachromasie da beginnt, wo die Vitalfärbung aufhört.

Wie schon oben ausgeführt wurde, tritt beim Zusammengeben von Farbstoff und chromotroper Substanz eine Fällung auf, wobei dem Aussehen nach dehydratisierte Partikel entstehen. Auch auf andere Weise konnte noch die Wasserarmut des metachromatischen Komplexes bewiesen werden. Die Membran einer *Euglena spec.* (wahrscheinlich *proxima*) wird mit Toluidinblau vollkommen rot gefärbt und beginnt sich nach einiger Zeit wellenförmig abzuheben. In stärkeren Konzentrationen gefärbt, zeigt sie streifige Struktur, mit verdünnten Farblösungen quillt sie stark auf und ist homogen. Diese Membranen behalten ihre Form und Färbung auch nach dem Austrocknen des Präparats, ein Zeichen, daß dieser Komplex völlig dehydratisiert ist. Auch nach der Dunkelfeldbeobachtung mußten wir eine Dehydratation annehmen. Mit Janusgrün oder Neutralrot gefärbte chromotrope Substanzen erzeugen im Ultramikroskop ein rotes bzw. grünes Streulicht, das nicht auf Fluoreszenz, sondern auf der Abbeugung des Lichts an den Komplexen einer bestimmten Größenordnung beruht. Die metachromatisch gefärbten Substanzen sind stark oder teilweise sogar völlig dehydratisiert und erhalten dadurch die Eigenschaften eines Suspensionskolloids, das sich im Dunkelfeld von einem hydrophilen Kolloid durch seine stark leuchtenden Teilchen unterscheidet. Diese Erscheinung ist also auch als ein weiterer Beweis für eine Dehydratisierung der Komplexe zu werten. Verändert man die Größe der Komplexe, erhält man alle Übergänge im Farbton, so wie man von feindispersen Gold, das im Ultramikroskop rot leuchtet, alle Übergänge bei größeren Phasen von Violett nach Blau erhält.

Die Reaktion zwischen den chromotropen Substanzen und den basischen Farbstoffen ist also eine spezifische, die darin besteht, daß sich beide Komponenten gegenseitig ausfällen. Der Komplex Farbstoff — chromotrope Substanz ist stark oder sogar völlig dehydratisiert. Der Farbstoff ist in ihm fest in sehr wasserarme Kolloidteilchen eingebaut und kann darum auch nur in der Form der „Farbsalzmoleküle“ vorliegen, da für eine Dissoziation des Farbsalzes kein Wasser vorhanden ist. Die Moleküle der betreffenden Farbsalze haben jeweils den metachromatischen Farbton, und darum ist auch der auffällige Farbumschlag verständlich. In weiten Bereichen ist dieser Komplex pH-beständig, und auch das ist jetzt leicht erklärlich, denn mit den H-Ionen der Umgebung kann er gar nicht in Wechselwirkung treten, da ja in den dehydratisierten Teilchen zu solch einer Reaktion gar kein Wasser zur Verfügung steht. Über das Verhalten der metachromatisch gefärbten Komplexe „Farbstoff — Nucleinsäure“ ist noch wenig bekannt. Die

Färbung ist jedoch mit der der Mucopolysaccharide nicht zu verwechseln. Bei letzterer ist die blitzartige Komplexbildung frappierend, während die Protozoenkerne bei direkter Einwirkung basischer Farbstoffe erst nach einiger Zeit den metachromatischen Farbton annehmen. Die Färbung kommt auch längst nicht mit der gleichen Regelmäßigkeit zustande wie bei den Mucopolysacchariden.

Was den Bindungsmodus betrifft, so gibt es in der organischen Chemie eine Reihe von Verbindungen, die in ihren Eigenschaften unseren bekannten metachromatischen Komplexen sehr gleichen. Es handelt sich hier um die sogenannten „Einschlußverbindungen“, die auf einer rein räumlichen Verbindungsbildung zwischen den Partnern beruhen. Es werden keine Haupt- und Nebenvaleenzen hergestellt, obwohl Wechselwirkungen der beiden Partner vorhanden sind, sondern das eine Molekül wird in den Hohlraum eines anderen vollständig eingebaut. Zwei Eigenschaften spielen also hierbei eine Hauptrolle: 1. Der einschließende Stoff muß Hohlräume aufweisen oder sie bei Gegenwart des einzuschließenden Moleküls bilden können; 2. der Addent muß in den Hohlraum hineinpasse. An Stelle der chemischen Reaktion tritt das räumliche Ineinanderpasse. „Eine Einschlußverbindung ist demnach eine Verbindung zwischen fertigen organischen Molekülen, die sich rein räumlich ineinanderfügen, wobei das Bindungssystem jedes Molekülgerüsts unverändert für sich erhalten bleibt“ (Cramer 1954, [16]). Die Einschlußverbindungen werden in drei Gruppen geteilt: 1. Gittereinschlußverbindungen, deren Hohlraum erst durch die Ausbildung eines Kristallgitters entsteht; 2. Moleküleinschlußverbindungen, hier besitzt das Molekül einen bereits vorgebildeten Hohlraum; 3. Inklusionsverbindungen makromolekularer Stoffe.

Auf nähere Einzelheiten soll hier nicht eingegangen werden², es sollen nur die Gemeinsamkeiten der metachromatischen Komplexe und der Einschlußverbindungen herausgehoben werden.

Als Einschlußverbindung hat sich z. B. die Jod-Stärke-Reaktion herausgestellt. Die intensive Blau- oder Violettfärbung der Stärke wurde bisher als eine Adsorption der Jodmoleküle an die Stärke gedeutet. Man weiß heute, daß die Amylose in einer Schneckenstruktur vorliegt und je Windung ein Atom Jod einschließt. Bekannt ist bei der Jodfärbung, daß sie beim Erhitzen reversibel verschwindet, eine Eigenschaft, die auch die metachromatischen Komplexe auszeichnet. Auch Agar, die vielgebrauchte Modellsubstanz für metachromatische Reaktionen mit basischen Farbstoffen, gibt eine blaue Jodfarbe, was nur Einschlußverbindungen tun, soweit man heute weiß. Bei Cramer (1954) finden sich auch Hinweise auf andere Substanzen, die ebenfalls die blauen Jodfarben hervorrufen, wie Inulin, Zellulose (gequollen), Amylose, Cholsäure usw. Hier soll dabei an die Befunde Burks [17] erinnert werden, der bei Modellversuchen mit reinen Polysacchariden mit schwacher Chromsäure oder anderen Mineralsäuren, die wahrscheinlich nur rein quellend wirken, Glykogen, Inulin und Stärkekörner metachromatisch färben konnte. Es ist bei diesen Substanzen also eine bemerkenswerte Übereinstimmung vorhanden, einmal darin, daß die Jod-„Metachromasie“ und die metachromatische Färbung mit basischen Farbstoffen an den gleichen Substanzen zustande kommt, zum anderen, daß diese Färbungen dem Temperatureffekt unterworfen sind. Eine Überein-

² Vgl. die ausführliche Darstellung in der Monographie von Cramer (Berlin 1954).

stimmung zeigt auch das Verhalten der Indikatoren in Einschlufkanälen, z. B. in Cyclodextrinen, den Abbauprodukten der Stärke. Sie haben einen bereits vorgebildeten Hohlraum, gehören also zur zweiten Gruppe, den Moleküleinschlufverbindungen. In diesen Hohlräumen schlagen die Indikatoren in ganz anderen pH-Bereichen um. So bleibt Methylorange auch in saurer Dextrinlösung gelb, Kongorot bildet mit Dextrin eine Einschlufverbindung und ist dann in saurer Lösung nicht mehr blau. Von den Schardingerdextrinen und auch sonst allgemein werden besonders lipophile Einschlufkomponenten bevorzugt, eine Eigenschaft, die auch für unsere basischen Farbstoffe in hohem Maße zutrifft.

Die schon weiter oben erwähnte Rotverschiebung beruht nach Scheibe [18] auf der Bildung van der Waalscher Additionsverbindungen. Sie kommen vorwiegend nach dem Grad der Wärmetönung als die Bindungsenergien für Einschlufverbindungen in Frage. In den Hohlräumen ist die Einwirkung auf das Elektronensystem besonders stark. Die dort herrschenden starken Feldkräfte verursachen offenbar ein alkalisches Medium. Ob nun in den metachromatischen Komplexen die Farbbase, das Farbsalz oder noch ein besonderer Zustand des Farbstoffs vorliegt, ist vorläufig noch nicht sicher zu entscheiden. Nach den oben diskutierten Arbeiten von Spek ist jedenfalls die Möglichkeit, daß es sich um das Farbsalz handelt, sehr wahrscheinlich.

Die negative Metachromasie der Nucleinsäuren wird ja ebenfalls von einer starken Rotverschiebung der Kurve begleitet, wobei der verstärkte orthochromatische oder ein anderer Farbton auftreten kann. Man kann diese Erscheinung noch am ehesten durch eine Einschlufverbindung erklären. Auch bei Cramer (1954 [16], S. 65) wird diese Vermutung ausgesprochen. Beachtlich ist auch die Stabilität dieser Färbungen gegenüber Säuren. Es liegt auch im Bereich der Möglichkeit, daß das begleitende Eiweiß den Komplex bildet. Auch für Eiweißsubstanzen sind Einschlufverbindungen nachgewiesen worden. So können z. B. Globine und Albumine Farbstoffe und auch Salze in dieser Weise binden. Komplexe von Ovalbumin und Kongorot sind z. B. auch bei pH 2 noch rot, während proteinfreie Pufferlösungen von diesem pH sofort nach Blau umschlagen. Das Zurückdrängen der Metachromasie durch Salze läßt sich so deuten, daß auch Salze in die Hohlräume eingeschlossen werden, die demnach den Farbstoff verdrängen. Auch die Tatsache, daß in der Zelle niemals chromotrope Substanzen nachgewiesen wurden, läßt sich an Hand der Einschlufverbindungen deuten. Die Hohlräume sind entweder von Salzen oder anderen Stoffen blockiert oder erlangen erst ihre erforderliche Größe für die Farbstoffeinklagerung durch die Quellung nach dem Austritt in das umgebende Medium.

Die aus der Zellphysiologie bekannten metachromatischen Reaktionen stimmen mit den aus der organischen Chemie bekannten Einschlufverbindungen in folgenden Punkten überein:

1. Einschlufverbindungen und metachromatische Reaktionen entstehen leicht beim Vorhandensein von starken Konzentrationen der beiden Bindungspartner.
2. Die Einschlufverbindung und die metachromatische Reaktion unterliegen dem Temperatureffekt.
3. Einschlufverbindungen und metachromatische Färbungen zeichnen sich durch sehr ähnliche Spektren und die Verschiebung der Maxima aus.
4. Ist von einigen chromotropen Substanzen nachgewiesen worden, daß sie Hohlräume bilden können, wie z. B. Agar.

5. Beiden Reaktionen ist eine weitgehende Beständigkeit gegenüber Säuren gemein.

6. In Einschlußverbindungen und bei metachromatischen Reaktionen verhalten sich Indikatoren wie in einem basischen Medium.

Die Natur dieser Einschlußverbindungen ist zwar noch nicht hinreichend geklärt, und es läßt sich heute auch noch nicht beweisen, ob es sich in unserem Falle wirklich um eine Einschlußverbindung handelt, da die genaue räumliche Struktur der genannten Polymeren bisher noch nicht bekannt ist. Das in vielen Fällen übereinstimmende Verhalten läßt aber doch vermuten, daß es sich bei den metachromatischen Komplexen ebenfalls um Einschlußverbindungen handelt. Wenn das wirklich der Fall sein sollte, dann wird durch die metachromatische Färbung lediglich nachgewiesen, daß die vorliegende Substanz den Farbstoff in seine Molekularstruktur einbaut. Es kann sich dabei um Polysaccharide, Nucleinsäuren, Eiweiße und andere makromolekulare Stoffe handeln.

Literatur

- [1] Lison, L., 1935: Sur la détermination du pH intracellulaire par les colorants vitaux indicateurs. *Protoplasma* 24.
- [2] — et C. Fautrez, 1935: L'étude physicochimique des colorants dans ses applications biologiques. — Etude critique. *Protoplasma* 33.
- [3] — 1935: Étude sur la metachromasie. *Arch. Biol. (Fr.)* 46.
- [4] — and W. Mutsaers, 1950: Metachromasy of nucleic acids. *Quart. J. microsc. Sci.* 91.
- [5] Bank, O., und H. G. Bungenberg de Jong, 1939: Untersuchungen über Metachromasie. *Protoplasma* 32.
- [6] Spek, J., 1940: Metachromasie und Vitalfärbung mit pH-Indikatoren. *Protoplasma* 34.
- [7] — und G. Gillissen, 1943: Die Zellmembran der Amöben eine chromotrope Substanz. *Protoplasma* 37.
- [8] Michaelis, L., 1947: The nature of the interaction of nucleic acids and nuclei with basic dyestuffs. *Quart. Biol.* 12.
- [9] — 1950: Reversible polymerisation and molecular aggregation. *J. Phys. Colloid. Chem.* 54.
- [10] Sheppard, S. E., and A. L. Geddes, 1945: *J. amer. chem. Soc.* 67.
- [11] Scheibe, G., 1938: Reversible Polymerisation als Ursache neuartiger Absorptionsbanden von Farbstoffen. *Kolloid-Z.* 87.
- [12] Michaelis, L., and S. Granick, 1945: Metachromasy of basic dyestuffs. *J. amer. chem. Soc.* 67.
- [13] Benazzi-Lentati, G., 1943: Sulla reazione metacromatica delle cellule indifferenziate del parenchima di alcuni Turbellari. *Monit. Zool. Ital.* 54.
- [14] Levin, A., and S. Maxwell, 1932: Metachromasy of Thiazine Dyes produced by Chondroitinsulfat. *J. amer. chem. Soc.* 74.
- [15] Rawson, R. A., 1942: The binding of T-1824 and structurally related Diazo dyes by the Plasma Proteins. *Amer. J. Physiol.* 158.
- [16] Cramer, F., 1954: Einschlußverbindungen. Berlin.
- [17] Burkl, W., 1951: Über den metachromatischen Färbefekt der mucoiden Drüsen nach Einwirkung von Chromsäure auf den histologischen Schnitt. *Anat. Anz.* 98.
- [18] Scheibe, G., und D. Brück, 1950: Zusammenhang physikalischer und chemischer Eigenschaften bei der Bildung van der Waalschen Molekeln. *Z. Elektrochemie* 54.

Kurze Mitteilungen

Speicherkonkurrenz im Protoplasten einiger Meeresalgen bei Rhodamin-B-Färbung

Von

Karl Höfler, Walter Url und Alfred Diskus

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

(Eingelangt am 24. Juli 1955)

Von einer Exkursion des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Wien in die Lagune von Venedig (27. März bis 6. April 1955) wurde reiches Algenmaterial in gutem Zustand nach Wien gebracht. Von verschiedenen orientierenden Versuchen, die wir in den folgenden Wochen vornahmen (vgl. Höfler, Url u. Diskus 1956) sei im folgenden eine Versuchsreihe mit Rhodamin B mitgeteilt.

Strugger (1936) hat dieses vorzügliche Fluorochrom in die botanische Mikrotechnik eingeführt und dargetan, daß es der unschädlichste von den üblichen basischen Vitalfarbstoffen ist. Wie Drawert (1939) zeigt, ist es so schwach dissoziiert, daß es im ganzen physiologischen Bereich von pH 2,0 bis pH 11 als elektroneutral gelten kann. Es wird vor allem von lipoiden Zellkomponenten gespeichert (Strugger 1938), doch geben u. a. auch Gerbstoffe lebhafte Speicherung. Volle Zellsäfte lassen in der Regel Diffusfärbung und nachher oft Fällung von Entmischungskugeln eintreten, leere Zellsäfte, die sich mit anderen Farbstoffen nach dem „Ionenfallenmechanismus“ anfärben, bleiben in Rhodamin B naturgemäß ungefärbt (Höfler 1949, 1953, Höfler und Schindler 1955); nur in solchen Zellen erfolgt Rhodamin-Speicherung im Cytoplasma.

Es kommt nun ganz auf das Objekt und das relative Speichervermögen der Zellenbestandteile an, ob man nach Rhodaminbehandlung vitale Plasma- oder Plastiden- oder Zellsaftfärbung erhält.

Wir behandelten drei von unseren Meeresalgen, nämlich *Polysiphonia* sp. aus der Lagune von Chioggia, *Cladophora* sp. und *Bryopsis plumosa* (vom Molo des Porto di Lido) in gleicher Weise durch 10 bis 15 Minuten mit Rhodamin B 1 : 5000, das in Seewasser vom Standort der Algen gelöst war.

Polysiphonia ergab in den stärkeren Ästen violette, diffuse Zellsaftfärbung. Diese erschien im Fluoreszenzmikroskop lebhaft goldbraun. Konnten bei Beobachtung im UV-Licht über die Lokalisation der Färbung noch Zweifel bestehen, so wurden diese durch Plasmolyseversuche behoben. Die Behandlung mit 2fach konzentriertem Seewasser ergab eine gute, großbuchtig-konkave Plasmolyse, und nun bestand kein Zweifel, daß die Zell-

wand farblos und der Zellsaft im UV-Licht diffus braungelb, im Hellfeld lila gefärbt war. Die Plasmaablösung erfolgte in den Rindenzellen von der Innenseite her. Allerdings wurden die Zellen durch die kräftige Plasmolyse binnen etwa 10 Minuten getötet: Rotalgenzellen sind ja am wenigsten plasmolyseresistent (Höfler 1950). Aber die Bilder eintretender Plasmolyse genügen, die Lokalisation der Färbung eindeutig festzulegen. Unsere *Polysiphonia* hat also „volle“ Zellsäfte. Das wurde durch grüne Fluoreszenzfärbung mit Acridinorange und gleichfalls grüne mit Coriophosphin, ferner durch blaue (nicht violette) Hellfeldfärbung mit Brillanteresylblau bestätigt.

Die Zellsäfte von *Polysiphonia* speichern den Rhodamin-B-Farbstoff so lebhaft, daß, wie es scheint, für Plastiden und Plasma kein Farbstoff übrigbleibt. Beide Zellbestandteile bleiben ungefärbt.

Cladophora sp.¹ vom nördlichen Molo des Porto di Lido verhielt sich ganz anders. Zellsaftfärbung tritt nach Rhodamin-B-Behandlung nicht auf. Dafür zeigen die Plastiden ein geradezu rapides Speichervermögen. Der zarte, netzig unterteilte Chromatophor zeigt sich braungrün im Hellfeld und so grell goldbraun im UV-Licht, daß die rote Eigenfluoreszenz des Chlorophylls völlig überdeckt erscheint.

Der Zellsaft bleibt ungefärbt, er ist wahrscheinlich „leer“ und nicht speicherfähig. Das Plasma bleibt farblos, die Plastiden lassen ihm keine Farbe übrig. Bei mehrfacher Wiederholung mit der gleichen *Cladophora* von anderen Lagunenstandorten um Venedig und um Chioggia bestätigte sich das maximale Speichervermögen der Plastiden, die im UV-Licht nach Rhodaminfärbung ein prächtiges Bild darbieten.

Ungleiches Speichervermögen der Plastiden verschiedener Algen ist von Höfler und Schindler seit mehreren Jahren an Süßwasseralgen beobachtet, aber bisher nur ganz kurz (z. B. 1951, 1151) beschrieben worden. Bei unserer marinen *Cladophora* erscheint die Speicherung maximal.

Wieder anders reagierte *Bryopsis*. Die Plastiden, die im natürlichen Zustand rote Eigenfluoreszenz zeigten, ließen nach Rhodamin-B-Behandlung kaum irgendwelche Umfärbung erkennen. Auch der Zellsaft speichert nicht im mindesten: violette Vitalfärbung mit Brillanteresylblau und Gelb- bzw. Rotfärbung mit Acridinorange im Hellfeld und UV-Licht bewiesen, daß die Zellsäfte „leer“ sind. Im Übersichtsbild beurteilt, speichern die *Bryopsis*-Zellen das Rhodamin B also nur schwach. Bei näherer Beobachtung und Anwendung stärkerer Vergrößerungen zeigte sich aber aufs deutlichste, daß überall im Plasma eine recht lebhaft Speicherung erfolgt war. Die Endfieder plasmolysierten besonders leicht mit glatten Plasmakonturen und ließen dann gelb fluoreszierende Plasmakappen erkennen. Auch die lebenden Plasmassäume an den Zellwänden leuchteten gelb. Die Frage, ob schon normales oder erst pathologisch verändertes Plasma infolge Rhodaminspeicherung im UV-Licht leuchtet, ließ sich dahin entscheiden, daß das geschädigte Plasma zwar verstärkt, daß aber auch gesundes Plasma schon deutlich speichert. Bei *Bryopsis* ist also das Plasma in der Speicherkonkurrenz nicht nur dem (leeren!) Zellsaft, sondern auch den Plastiden überlegen. An einigen Spitzen der Ästchen war Entmischung im Plasma eingetreten. Die Lipoidkügelchen waren deutlich verstärkt gelb gefärbt. Ähnliche Bilder

¹ Aus der Gruppe der *Cladophora nitida*, vielleicht *Cl. Ruchingeri* (die Kützing aus der Lagune von Venedig beschrieben hat, von der Mehrzahl der Autoren zu *Cl. nitida* gezogen). Die Zuweisung zu einer der bei Schiffrner und Vátova (1938, S. 180) unterschiedenen Kleinarten bleibt nachzutragen.

hat Hofmeister (1948) an mit Chrysoidin gefärbtem Plasma der Innenepidermis von *Narcissus*-Zwiebeln beschrieben. Läßt man Pyronin (Strugger 1941), gelöst in alkalisch gemachtem Seewasser, auf *Bryopsis* einwirken, so speichert das Plasma die Pyroninbase zu zartblauer Fluoreszenz.

Bryopsis erscheint als eines der vorzüglichsten Objekte für vitale Plasmafärbung, es ist selbst dem klassischen Objekt, der Innenepidermis der Schuppen ruhender Zwiebeln, überlegen.

Literatur

- Drawert, H., 1939: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. I. Versuche mit Rhodaminen. *Planta* 29, 376.
- Höfler, K., 1930: Das Plasmolyseverhalten der Rotalgen. *Z. Bot.* 23, 370.
- 1949: Fluorochromierungsstudien an Pflanzenzellen. Beiträge zur Fluoreszenzmikroskopie. *Mikroskopie*, Wien. 1. Sonderband, S. 46.
- 1951: Fluorochromfärbung am lebenden Protoplasten. *Mikrochemie*, Bd. XXXVI und XXXVII (Bericht über den 1. Internat. Mikrochem. Kongreß, Graz 1950), S. 1146.
- 1953: Zur Vital- und Fluoreszenzfärbung. Vortrag, gehalten auf der Botanikertagung in Hamburg am 25. August 1953. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 66, 453.
- und Schindler, H., 1953: Volle und leere Zellsäfte bei Algen. *Protoplasma* 45.
- W. Url und A. Diskus, 1956: Zellphysiologische Versuche und Beobachtungen an Algen der Lagune von Venedig. *Boll. Soc. Veneziana e di Museo Civico di Storia Nat.* (im Druck).
- Hofmeister, L., 1948: Vitalfärbungsstudien mit Chrysoidin. *S.ber. Ost. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl., Abt. 1*, 157, 35.
- Schiffner, V., und A. Vatoa, 1938: Le alghe della Laguna di Venezia. Estratto dalla Monografia „La Laguna di Venezia“, Vol. III, Parte V, Tomo IX.
- Strugger, S., 1936: Die Vitalfärbung der Chloroplasten von *Helodea* mit Rhodaminen. *Flora* 131, 113.
- 1938: Die Vitalfärbung des Protoplasmas mit Rhodamin B und 6G. *Protoplasma* 30, 85.
- 1941: Zellphysiologische Studien mit Fluoreszenzindikatoren. I. Basische, zweifarbige Indikatoren. *Flora* 35, 101.

PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

ROBERT CHAMBERS
NEW YORK

NOBURÔ KAMIYA
OSAKA

SIEGFRIED STRUGGER
MÜNSTER

HERAUSGEGEBEN VON

JOSEF SPEK
ROSTOCK

FRIEDL WEBER
GRAZ

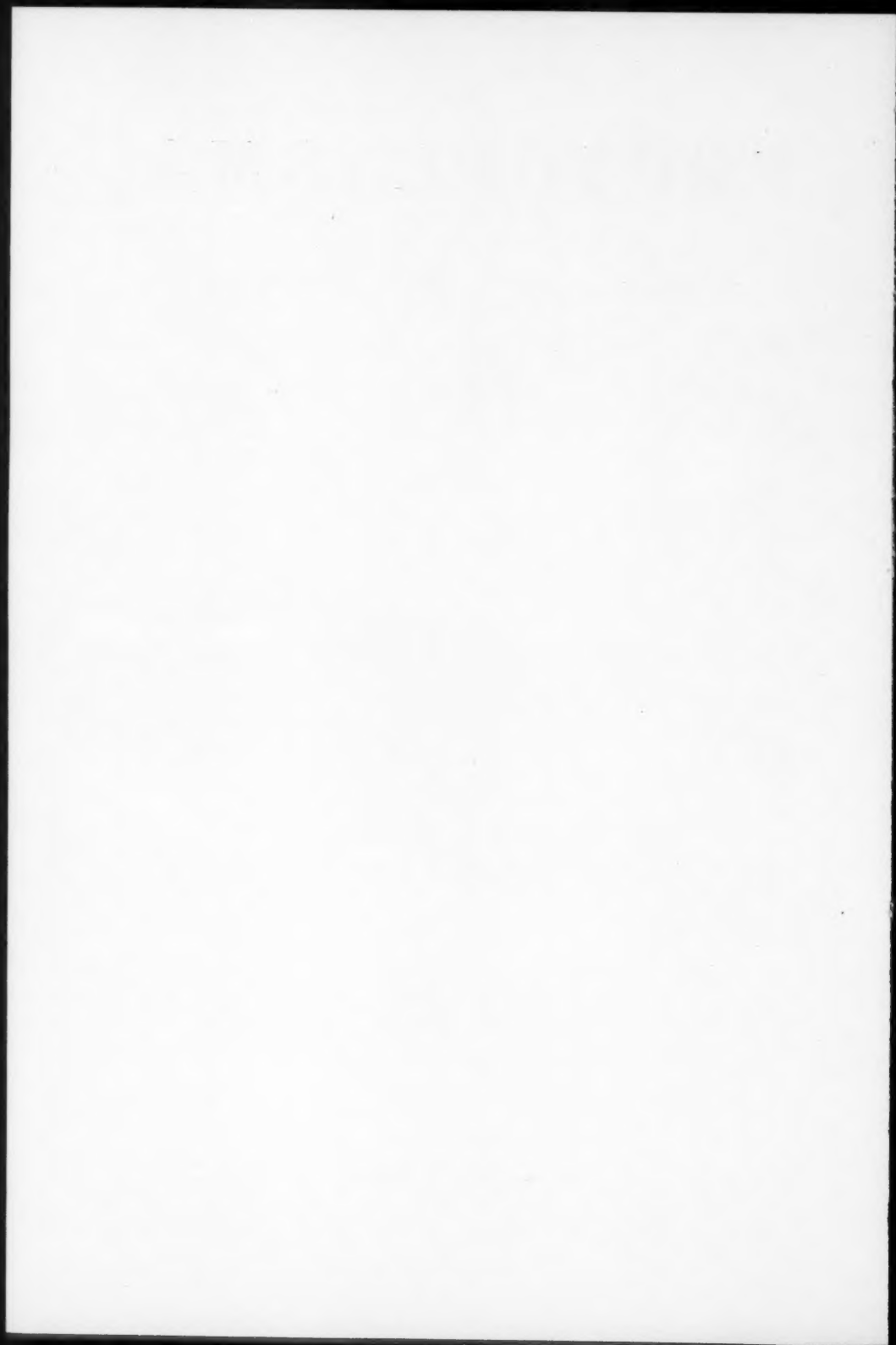
KARL HÖFLER
WIEN

XLV. BAND

MIT 324 TEXTABBILDUNGEN UND 2 TAFELN



WIEN
SPRINGER-VERLAG
1956



Inhalt

Abhandlungen

Seite

Amelunxen, F.: Beobachtungen über die Entwicklung der Eiweißspindeln bei Cactaceen (Vorläufige Mitt.)	164
— — Über die Strukturanalyse der Eiweißspindeln der Cactaceae (Vorl. Mitt.)	228
Badenhuizen, N. P.: The Structure of the Starch Granule	315
Bairati, A., and F. E. Lehmann: Structural and Chemical Properties of the Contractile Vacuole of <i>Amoeba proteus</i>	525
Böing, J.: Vitaluntersuchungen über die Kontinuität der Granastruktur in den Chloroplasten von <i>Helodea densa</i>	55
Currier, H. B., and W. van der Zweep: Plasmolysis and the Tetrazolium Reaction in <i>Anacharis canadensis</i>	125
— — and S. Strugger: Aniline Blue and Fluorescence Microscopy of Callose in Bulb Scales of <i>Allium Cepa</i> L.	552
Diskus, A.: Färbestudien an den Schleimkörperchen und Schleimausscheidungen einiger Euglenen	460
Erdmann, K.: Versuche zur Aufhebung der koagulierenden Wirkungen von ultravioletttem Licht und von Röntgenstrahlen auf Euglobulin mit Strahlen-Schutzstoffen	293
Fasse-Franzisket, Ursula: Die Teilung der Proplastiden und Chloroplasten bei <i>Agapanthus umbellatus</i> L'Hérit.	194
Flasch, Assunta: Die Festigkeit der Bindung einiger basischer Farbstoffe in vitalgefärbten Pflanzenzellen	593
Frey-Wyssling, A., F. Ruch und X. Berger: Monotrope Plastiden-Metamorphose	97
Hagedorn, H.: Untersuchungen über den isoelektrischen Punkt bei Actinomyceten	115
Höfler, K., und H. Schindler: Volle und leere Zellsäfte bei Algen	173
Huber, Elfriede: Über den schädigenden Einfluß von Neutralrot auf <i>Spirogyra</i> -Zellen	491
Kaho, H.: Untersuchungen über die antagonistische Wirkung von Mono- und Disacchariden und chemisch nahestehenden Stoffen bei der Wirkung einiger Elektrolyte auf das Pflanzenplasma. I. Mitteilung	560
Kaunat, H.: Die Wirkung von Antibiotika auf <i>Paramaecium caudatum</i>	1
Kamiya, N.: In memoriam WILLIAM SEIFRIZ	513
Kinzel, H.: Zur Kausalfrage der Zellwand-Fluorochromierung mit Akridinorange	73
Markert, Susanne: Untersuchungen über den Einfluß von Elektrolyten auf die Viskosität von pflanzlichen Solen	37
Mühlethaler, K.: Untersuchungen über die Struktur und Entwicklung der Proplastiden.	264
Penso, G.: Cycle of Phage Development Within the Bacterial Cell	251
Pfeiffer, H. H.: Quantitative Versuche über das Fadenziehvermögen von Fibroblasten	157
Reiter, Liselotte: Zerfall homogener <i>Epiphyllum</i> -Eiweißspindeln in Fibrillen.	615
Stalfelt, M. G.: The Protoplasmic Viscosity of Terrestrial Plants and Its Sensitivity to Light	285
Strugger, S., und M. Losada-Villasante: Die Plastiden in den albicaten Geweben der Blätter einer mediovariegaten Form von <i>Chlorophytum comosum</i>	540
Stubbe, W., und D. v. Wettstein: Zur Struktur erblich verschiedener Chloroplasten von <i>Oenothera</i>	241

Inhalt	Seite
Thaler, Irmtraud: Die Plastiden der <i>Cerinth</i> -Epidermis	483
— — Eiweißkristalloide von <i>Lilium tigrinum</i>	486
Weber, F.: Eiweißspindeln und -kristalle in <i>Scutellaria</i>	478
Weihe, K. v.: Die Bedeutung der Grenzflächenenergie für die Gestaltung der Zelle	327

Sammelreferate

Baumeister, W.: Über den Einfluß des Zinks auf das Pflanzenwachstum	133
Woochsmann, H.: Der Stand des Metachromasieproblems	618

Kurze Mitteilungen

Höfler, K., W. Url und A. Diskus: Speicherkonkurrenz im Protoplasten einiger Meeresalgen bei Rhodamin-B-Färbung	630
Kiermayer, O.: Ringförmige Zellinhaltskörper bei <i>Spirogyra maxima</i>	150
Kinzel, H.: Ein einfaches Mikrokolorimeter	280
Reiter, Liselotte: Einschlüsse im Zellkern von <i>Campanula</i>	507
— — Virus-Übertragung zwischen <i>Aichryson</i> -Arten	509
— — Eiweißwürfel in <i>Solanum demissum</i>	633

Referate	155, 284, 512, 635
---------------------------	--------------------

Eiweißwürfel in *Solanum demissum*

Von

Liselotte Reiter

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz

Mit 2 Textabbildungen

(Eingelangt am 2. September 1955)

Cohn (1860) hat zuerst das Vorkommen würfelförmiger Eiweißkristalle im subperidermalen Parenchym der Kartoffelknolle beschrieben. Er untersuchte bereits ihr chemisches, färberisches und polarisationsoptisches Verhalten. Über die Bedingungen, unter denen diese Kristalle auftreten, wurde nichts berichtet, es wird lediglich betont, daß manche Kartoffelsorten keine Kristalle enthalten. Heinricher (1891) fand ein massenhaftes Auftreten von solchen Kristallen in Kartoffelpflanzen, die ein krankes Aussehen hatten. Seitdem es bekannt ist, daß die Kartoffel eine Kulturpflanze ist, die besonders häufig, ja oft regelmäßig Viren verschiedener Art enthält, und seitdem man weiß, daß Viren sich nicht nur in vitro, sondern auch in der lebenden Zelle in Kristallform ausscheiden können (Literatur bei Bawden 1950, Köhler u. Klinkowski 1954), hat man daran gedacht, daß die Eiweißwürfel der Kartoffelknolle Viruskristalle sein könnten. Diese Vermutung war naheliegend, weil Eiweißkristalloide anderer Gestalt (Spindel, Nadelbündel) im Parenchym von Kartoffelknollen zu sehen sind, die an x-Virus erkrankt sind (Köhler 1942). Eicke und Köhler (1943) haben beobachtet, daß bei der Kartoffelsorte „Juli“, die bis zu 99% von A-Virus befallen ist, in der ganzen Pflanze besonders viele Eiweißwürfel auftreten. Sie haben an dieser Pflanze die Frage zu entscheiden versucht, ob diese Würfel Viruskristalle sind. Es zeigte sich, daß zwar die Eiweißnatur der Würfel außer Frage steht, daß aber dieses Protein weder aktives noch inaktives Viruseiweiß ist.

Eine Stütze dieser Ansicht dürfte dann gegeben sein, wenn in aus Samen gezogenen Wildkartoffeln Proteinwürfel vorkommen. Es wurden Keimlinge von *Solanum demissum* untersucht. Diese Pflanze wird als Testobjekt zur Unterscheidung von verschiedenen Arten des Kartoffelvirus verwendet. Die Symptome, die an der Wildkartoffel auftreten, sind nämlich für die Er-



Abb. 1. *Solanum demissum*. Drüsenhaar mit Eiweißkristallen.

krankung an verschiedenen Viren viel charakteristischer als die bei *Solanum tuberosum* bei verschiedenem Virusbefall. Die Samen wurden in einem Institutsraum, in dem sich keine anderen Pflanzen befanden, zur Keimung gebracht. Schon in den ersten Blättern des Keimlings waren regelmäßig Proteinwürfel zu finden, und zwar zuerst und am zahlreichsten in den vielzelligen Köpfchen der Drüsenhaare (Abb. 1); die Borstenhaare und die Schließzellen enthielten keine Kristalle. Die Pflanzen wurden später ins Freie gesetzt und entwickelten kleine Knollen. In letzteren, in den Blättern, in den Blüten, überall fand man die Eiweißkristalle (Abb. 2. a, b

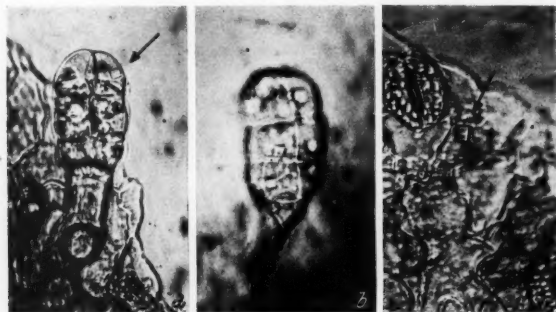


Abb. 2. a und b: *Solanum demissum*, Drüsenhaar mit Eiweißkristallen. c: *Solanum demissum*, Blattepidermis mit Eiweißkristall.

und c). Die Knollen überwinterten im Freien und die im zweiten Jahr sich daraus entwickelten Pflanzen hatten wieder Proteinkristalle.

Dieses Ergebnis, nämlich die Tatsache, daß auch aus Samen gezogene Wildkartoffeln die Eiweißkristalle bilden, spricht wohl gegen die Möglichkeit, daß bei der Kartoffel die Eiweißwürfel Viruskristalle sind. Andererseits ist es überraschend, daß bei der Kartoffel Eiweißspindeln, Fasern als in Zusammenhang mit Virusbefall stehend betrachtet werden, Eiweißwürfel aber nicht. Ein Polymorphismus von Eiweißkristalloiden in ein und derselben Pflanze kommt bei Kakteen und anderen Pflanzen vor. Man möchte eigentlich meinen, daß dann entweder alle diese Kristalle „Viruskristalle“ sind oder keine. Eine endgültige Entscheidung scheint noch nicht gefallen zu sein.

Literatur

- Bawden, 1950: Plant Viruses and Virus Diseases. Waltham, Mass.
 Cohn, 1860: Über Proteinkristalle in den Kartoffeln. Jber. Schles. Ges. vaterl. Kultur.
 Eicke und Köhler, 1945: Beobachtungen an den Eiweißkristallen der Kartoffelsorte „Juli“. Protoplasma 38.
 Heinricher, 1891: Über massenhaftes Auftreten von Krystalloiden in Laubtrieben der Kartoffelpflanze. Ber. dtsch. Bot. Ges. 9.
 Hubert, 1914: Über das massenhafte Auftreten von Eiweißkristalloiden in Kartoffelblättern. Österr. Botan. Z. 64.
 Köhler, 1942: Über das Vorkommen von Eiweißkristallen in virusinfizierten Kartoffelknollen. Nachrichtenblatt dtsch. Pflanzenschutzdienst 22.
 — und Klinkowski, 1954: Viruskrankheiten. Berlin.

Referate

Blunck, H.: Fortschritte im Wissen vom Wesen und Wirken der Viruskrankheiten. (Nach einem auf der 117. wissenschaftlichen Tagung des Naturhistorischen Vereins der Rheinlande und Westfalens am 27. November 1954 in Bonn gehaltenen Vortrag.) Mit 41 Abb., 66 S. Verlag Eugen Ulmer, z. Z. Ludwigsburg/Württ., 1955. DM 5.80.

Über Viren und Virose, ein Arbeitsgebiet, das heute im Scheinwerferlicht aktuellen Interesses steht, gibt es jetzt schon eingehende zusammenfassende Darstellungen; aber der gewichtige Umfang dieser Handbücher, Bücher und Zeitschriften schreckt manchen Biologen, der nicht selbst als Virologe arbeitet, ab, sie in die Hand zu nehmen. Und doch ist die Kenntnis der rapiden Fortschritte auf diesem Gebiete für jeden Biologen, ob er nun Mediziner, Botaniker oder Zoologe ist, von nicht zu überschätzender Wichtigkeit, denn die hier gewonnenen neuen Einsichten rühren an die Grundbegriffe des biologischen Weltbildes. Es ist daher zweifellos ein Verdienst, die vielseitige Materie in wirklich knapper und doch kaum Wesentliches übersehender, leicht verständlicher Darstellung gebracht zu haben. Bemerkungen über die wirtschaftliche Bedeutung der Virose leiten die Schrift ein, führen die Wichtigkeit der Virologie drastisch vor Augen. Das Kapitel über „Krankheitssymptome“ mußte natürlich kurz gebracht werden, aber vielleicht hätten doch die mikroskopisch sichtbaren Symptome (Einschlußkörper, x-bodies, Kristalle) etwas mehr Beachtung verdient. Ausführlicher behandelt sind die „Übertragungsarten“. Besonderes Interesse werden natürlich die Kapitel „Physikalische und chemische Eigenschaften der Viren“, „Vermehrungsmechanismus“, „Natur und Entstehung der Viren“ finden. Gerade hier ist zwischen bereits feststehenden Tatsachen und Hypothesen reinlich geschieden. Die Literatur ist soweit angeführt, daß sich auch der Nichtspezialist weiterhelfen kann. Es ist erfreulich, daß der Schrift zu relativ niederem Preise so ausgezeichnete Abbildungen beigegeben werden konnten.

F. Weber (Graz).

Haas, J.: Physiologie der Zelle. Mit 46 Abb., 474 S., 2 Tafeln. Berlin-Nikolassee: Verlag Gebrüder Borntraeger, 1955.

Die Zellphysiologie hat sich in den letzten Jahrzehnten so stürmisch entwickelt und so vielseitige Fortschritte gemacht, daß frühere lehrbuchartige Darstellungen dieser Disziplin, wenn sie auch zeitlich noch gar nicht weit zurückliegen, durchaus als veraltet angesehen werden müssen. Deshalb bestand tatsächlich ein Bedürfnis nach einer ganz neuen Fassung des mächtig angewachsenen Tatsachenmaterials. Es war gewiß nicht leicht, eine solche zu geben, denn der Stoff wächst und verändert sich fast von Tag zu Tag. Autor und Verlag haben den Wettlauf mit der ständig zu entgleiten drohenden Materie gewagt und — man darf wohl sagen — gewonnen. Es ist erstaunlich, in fast allen der 15 Kapitel die neueste Literatur zitiert und nicht allein zitiert, sondern auch verarbeitet und im Gesamtbild, dem keine wichtigen Farben fehlen, verwertet zu finden. Natürlich konnte der Autor

nicht überall aus erster Quelle schöpfen, aber er hat zweifellos eine ausgezeichnete Wahl getroffen unter den kritischen Zusammenfassungen, denen er sich anvertraut hat. Kleine Irrtümer kommen wohl auch in diesem ausgezeichneten Buche vor und Druckfehler werden bei der nächsten Auflage auszumergen sein. So soll es Seite 422 nicht Plasmatypos, sondern Plasmotyse heißen; Seite 334 nicht Höfer, sondern Höfler; Seite 120 nicht Willstädter, sondern Willstätter. Der I. Abschnitt des Buches (Molekulare Morphologie) umfaßt die Kapitel: Die Makromolekeln. Die Proteine. Die Nukleinkörper. Die Enzyme. Die Lipide. Der II. Abschnitt (Die Organe der Zelle) gliedert sich in: Das Grundcytoplasma. Das Grenzgebiet der Zelle. Mitochondrien und Mikrosomen. Der Zellkern. Die Interphasenchromosomen. Abschnitt III (Die Funktion der Zelle) behandelt: Die Atmung der Zelle. Der Stoffaustausch der Zelle. Die Teilung der Zelle. Das Wachstum der Zelle. Die Differenzierung der Zelle.

F. Weber (Graz).

Johnson, F. H.: The Luminescence of Biological Systems. Mit vielen Textabb. 452 S. Washington: Amer. Association for the Advancement of Science, 1955.

Der Band enthält 17 Vorträge und die Diskussionsbemerkungen, die auf der Tagung „Luminescence of Biological Systems“ des Committee on Photobiology der National Academy of Sciences vom 28. März bis 2. April 1954 in Asilomar (Kalifornien) gehalten wurden. Es ist im Rahmen eines kurzen Referates nicht möglich, auf die Beiträge im einzelnen einzugehen. Das Symposium wird eingeleitet durch eine Übersicht über die leuchtenden Organismen mit einer tabellarischen Zusammenstellung (Harvey); eine umfassende Darstellung der leuchtenden Organismen Ostasiens gibt Haneda, die Ökologie mariner Dinoflagellaten behandelt Ryther, der Physiologie und Ökologie speziell von *Gonyaulax polyedra* widmen Haxo und Sweeney einen Artikel. Die Spektroskopie und die Kinetik der Lumineszenzerscheinungen (inkl. der photosynthetisch wirksamen Pigmente) behandeln Becker und Kasha, Arnold, French, Wilhelmssen et al. und Spruit. Breiten Raum nimmt die Biochemie der Leuchtvorgänge von *Cypridina* (Tsuji et al.), des Leuchtkäfers (McElroy und Hastings, Strehler) sowie des bakteriellen Leuchtens (Strehler, Hastings und McElroy) ein; die Abhängigkeit des Leuchtens von O_2 -Tension, Metallionen, Temperatur, ADP usw. behandeln Johnson, Nicol sowie Buck. — Die Beiträge fügen sich zu einer monographischen Darstellung unserer heutigen Kenntnisse über das biologische Leuchten zusammen, wobei die Darstellung auch auf die verwandten Lumineszenzerscheinungen z. B. in der Photosynthese übergreift. Die bei der Aneinanderreihung von Originalbeiträgen geringere Einheitlichkeit und Übersichtlichkeit wird durch ausführliche Register (der Namensindex umfaßt allein sieben doppelspaltige Seiten) etwas ausgeglichen. Liegt das Schwergewicht des Buches auch auf physikochemischem Gebiet, so muß doch mit Freude vermerkt werden, daß zum Unterschied von so manchem derartigen Symposium die Biologie nicht zu kurz kommt!

O. Härtel (Graz).

Kühn, Alfred: Vorlesungen über Entwicklungsphysiologie. Mit 447 Abb. IX, 506 S. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag, 1955. Ganzl. DM 43.60.

Wenn uns Alfred Kühn diesmal mit einem Werke, das als Vorlesung abgefaßt ist, entgegentritt, so darf dies wohl als Ausdruck seines inneren

Bedürfnisses erscheinen, durch die Wahl gerade dieser Form den behandelten Stoff dem Leser ganz besonders naherücken zu wollen. Eines Stoffes übrigens, von dem wir bisher gewöhnt waren, ihn als geschlossenes Spezialgebiet dargestellt zu sehen, der uns aber hier gerade in seinem intimen Kontakt mit den Grundproblemen der Biologie, d. h. mit dem Wissen um die Lebensvorgänge der Zelle sowie den Gesetzmäßigkeiten und physiologischem Geschehen der Vererbung, vorgestellt wird. Aus der so gegebenen weiten Schau der Probleme der Entwicklungsphysiologie erhellt deutlich deren, man möchte fast sagen, zentrale Stellung innerhalb der allgemeinen Biologie.

Wieder treffen wir hier die meisterhafte Darstellung, die für A. Kühn so typisch ist, die klare Sprache und vorzügliche Bebilderung des Werkes.

Das Buch beginnt mit einer schönen Übersicht cytologischer Grundlagen, die in kurzer und prägnanter Form die Erkenntnisse über den Zellkern und die Chromosomen vermittelt. Die Besprechung der Vorgänge des Wachstums von Kern und Cytoplasma leiten über zur Darstellung der Biologie einzelliger Lebewesen, an die sich dann jene einfacher mehrzelliger und kolonienbildender Formen anschließt.

Den Vorlesungen über Befruchtung und Primitiventwicklung folgen solche, die der Entwicklungsphysiologie der Echinodermen, der Amphibien, der Ascidien sowie der Arthropoden gewidmet sind.

Aber auch die Entwicklungsvorgänge höherer Pflanzen werden im Rahmen dieses Werkes entsprechend gewürdigt. Dadurch weitet sich das gegebene Bild der Erkenntnisse und Probleme entwicklungsphysiologischen Geschehens noch bedeutend aus. Nachdem noch auf die Bildung von besonderen Strukturelementen im Zusammenhange mit den Differenzierungsprozessen (Ausbildung von Stützgeweben) näher eingegangen wird, schließt das Buch mit genetischen und genphysiologischen Kapiteln.

Die Determinations- und Induktionsvorgänge, aber auch die Gefällesysteme der Embryogenese sind engstens verknüpft mit Fragen der Struktur und des Chemismus des Protoplasmas. Damit führt natürlich die Kausalanalyse des Entwicklungsgeschehens immer wieder direkt in das Gebiet der Protoplasmaforschung hinein. So greift nicht nur der Entwicklungsphysiologe, sondern jeder, dem die Grundprobleme der Biologie am Herzen liegen, gewiß gerne zu diesem schönen Werke und wird es nur mit Bewunderung und innerem Danke an den Autor für die große geleistete Arbeit wieder aus der Hand legen.

E. K u p k a (Graz).

Papierchromatographie in der Botanik. Bearb. v. H. Dörfel, R. Häusel, H. F. Linskens u. a. Mit 63 Textabb., 76 Tab., XII, 253 S. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag, 1955. Ganzl. DM 38.—.

Die Papierchromatographie hat sich als überaus elegante Methode zur Trennung, Identifizierung und innerhalb gewisser Grenzen auch zur quantitativen Bestimmung von Stoffen, die mit den klassischen Methoden der Chemie nicht oder nur unvollkommen getrennt werden können, längst ihren sicheren Platz vor allem im biochemischen Laboratorium gesichert. Der Pflanzenphysiologe, insbesondere wenn er sich mit biochemischen und Stoffwechselfragen befaßt, wird dem Herausgeber Dank wissen, daß er mit einem Stabe erfahrener Mitarbeiter die Methoden speziell für seinen Bedarf gesichtet und in vorliegendem Buche zusammengetragen hat. Einleitend werden kurz die Einrichtung des chromatographischen Laboratoriums, das Grundsatzliche der chromatographischen und der Papier-elektrophorese-Technik sowie die hiezu nötigen Geräte beschrieben (auf einige Bezugsquellen wird jeweils hingewiesen). Ausführlich wird die Isotopentechnik behandelt. Besonderer Wert wird auf die Vorbehandlung

des Materials als Voraussetzung einer sauberen Trennung gelegt; die Methoden sind bei knapper Darstellung so eingehend beschrieben, daß ein Nacharbeiten ohne besondere Schwierigkeiten möglich sein dürfte (die Originalliteratur ist am Schluß jedes Abschnittes angeführt). Neben den Abschnitten über anorganische Ionen, Kohlehydrate, organische Säuren, Proteine (inkl. Enzyme) sei insbesondere auf diejenigen über Wirkstoffe, Vitamine, Hemmstoffe, Antibiotica hingewiesen, sogar Welketoxine werden berücksichtigt. Das Buch wird in keinem Laboratorium, in dem chromatographisch gearbeitet wird, fehlen dürfen. Auch für den Protoplasmatiker, der die Stoffe ja weniger im extrahierten Zustand, sondern als Träger von Strukturen interessieren, wird das Buch von Wert sein, weil es die Möglichkeiten erkennen läßt, die heute zur Trennung und Erkennung aller kleinster Mengen von Stoffen, selbst wenn sie chemisch noch nicht genau bekannt sind, bestehen.

O. Härtel (Graz).

Molisch, Hans : Botanische Versuche und Beobachtungen ohne Apparate.

Ein Experimentierbuch für jeden Pflanzenfreund. 3., umgearbeitete und ergänzte Auflage. Herausgegeben von Richard Biebl. — Mit 67 Abb. im Text. XI, 172 S. Stuttgart: G. Fischer, 1955. DM 12.40.

Unter dem Leitmotiv „je einfacher das Experiment, desto schöner ist es“ gab Molisch im Jahre 1931 dieses volkstümliche Buch heraus. Man bewundert daran die meisterhafte Beobachtungsgabe und die Klarheit der Darstellung. Nach dem Tode des Verf. übernahm Biebl die Neubearbeitung des Buches. Während die zweite Auflage im großen und ganzen unverändert blieb, weist die dritte einige bereits notwendig gewordene Änderungen und Ergänzungen auf. So wurde z. B. eine zweckmäßigere Einteilung des Stoffes vorgenommen. Man findet z. B. „Anthokyan und Temperatur“, „Farbänderungen“ nicht mehr unter „Chemisches“, sondern im Kapitel „Die Farbe der Pflanze“. Das hat den Vorteil, daß alles über die Farbe, ob Chemisches oder Physikalisches, in einem Abschnitt zusammengefaßt wird. Viele neue einfache Versuche wurden meisterhaft in den Stoff eingebaut, ohne daß die Einheitlichkeit des Buches darunter litt. Zum großen Erfolg dieses Buches haben nicht zuletzt auch die Abbildungen beigetragen, die in der dritten Auflage erneuert und vermehrt wurden. Alle Pflanzenfreunde werden sich über das Erscheinen der neuen verbesserten Auflage freuen und sind dem Herausgeber und dem Verlag, der diese Auflage bestens ausstattet, zu Dank verpflichtet.

I. Thaler (Graz).

Protoplasmatologia, Handbuch der Protoplasmaforschung. Hgg. von L. V.

Heilbrunn und F. Weber. Bd. II, B, 2 C: J. Small: **The pH of Plant Cells.** With 3 figures, 116 pag. Floyd J. Wiercinsky: **The pH of Animal Cells.** With 7 figures, 56 pag. Wien: Springer-Verlag, 1955. S 270.—, DM 45.—, \$10.70, sFr. 46.—, £3/16/6.

Seit der ersten zusammenfassenden Darstellung der Messung des intracellulären pH pflanzlicher Zellen (Small, Protoplasma-Monogr., Bd. 2) sind nunmehr 26 Jahre vergangen. Hat dieser Gegenstand inzwischen auch mehrfache Detail- und Sammeldarstellungen aus der gleichen Feder erfahren (z. B. Small, pH and Plants, London 1949), so darf ein ausführlicher Abschnitt in einem großangelegten Handbuch keinesfalls fehlen. Trotz geringeren Umfanges (Wegfall methodischer Kapitel und Beschränkung theoretischer Erörterungen) darf dieser Beitrag in gewissem Sinne als zweite Auflage der Darstellung in den Protoplasma-Monographien angesehen und begrüßt werden. Eine Fülle neuen, mit der Small'schen Me-

thode gewonnenen Zahlenmaterials wird geboten; insbesondere sei auf die neuen Abschnitte über Versuche zur Bestimmung des pH von Chloroplasten, Granula etc. hingewiesen. Die Smallsche „Range Indicator Method“ (R. I. M., andere Methoden finden in diesem Beitrag nur nebenbei Erwähnung) gestattet zwar nur die Abgrenzung bestimmter pH-Bereiche, innerhalb deren das pH liegt, und nicht die Bestimmung des pH-Wertes selbst; sie vermeidet aber, da sie nur die Endfarben der Indikatoren berücksichtigt, alle Fehler, die aus der Abschätzung der Zwischenfarben erwachsen. Ein größerer Grad an Genauigkeit, etwa auf mehrere Dezimalen, ist nach Small überhaupt unmöglich, da die H-Ionenkonzentration an sich gar nicht gemessen werden kann, sondern das pH sich nur aus dem Vergleich der H-Ionenaktivitäten der Probe mit Lösungen von bekanntem pH ergibt (britischer und amerikanischer Standard: 0,05 mol saures K-Phthalat gilt als pH 4,000). Wiercinski wendet dagegen mit Recht ein, daß die Sørensen'sche Definition des pH-Begriffes ohnedies von dem Aktivitätsbegriff ausgegangen ist. Ob solche Unterscheidungen für den Biologen von heuristischem Wert sind, muß vorläufig noch dahingestellt bleiben.

Wiercinski's Beitrag über das pH der tierischen Zellen ergänzt den vorhergehenden insofern, als hier theoretischen Erwägungen breiterer Raum gewidmet ist und auch die verschiedenen Möglichkeiten und Methoden der Messung des pH der Zellen ausführlicher dargestellt sind. Eine tabellarische Darstellung von pH-Messungen aus den verschiedensten Abteilungen des Tierreiches (18 Seiten) wird infolge der dadurch gegebenen Vergleichsmöglichkeiten das Einarbeiten in die Methoden zweifellos erleichtern. Es darf aber nicht vergessen werden, daß der pH-Wert an sich ja noch nicht allzuviel besagt und nicht losgelöst vom übrigen Zellgeschehen betrachtet werden kann (bei Small finden sich Abschnitte über Zusammenhänge zwischen pH und periodischen Vorgängen, Spaltöffnungsbewegungen, Chlorose und Wuchsstoffen); es könnte dies leicht zu einer ähnlichen Überschätzung des pH führen, wie dies z. B. in der Bodenkunde der Fall war. — Ungewöhnlich erscheint es dem Ref., daß im gleichen Band, in der gleichen Lieferung, beide Artikel von Seite 1 beginnend paginiert wurden. Dies bedeutet zweifellos eine Erschwerung im Aufsuchen und im Zitieren.

O. Härtel (Graz).

Rippel-Baldes, A.: Grundriß der Mikrobiologie. Dritte Auflage. Mit 160 Abb., V, 418 S. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag, 1955. Geb. DM 45.—.

Das Stoffgebiet der Mikrobiologie, das Rippel-Baldes in formvollendeter Darstellung gestaltet hat, wurde in diesem Lehrbuch so umgrenzt, daß es alles das bietet, was als Ergänzung dessen erwünscht und wirklich nötig ist, „was schon, insbesondere in der Botanik, bisher gelehrt wurde“. Damit wird ein heterogener Hörerkreis erfaßt und befriedigt, der sich „aus Naturwissenschaftlern, Chemikern und Landwirten zusammensetzt“. Erst bei gründlichem Studium des Buches wird man sich voll und ganz bewußt, wieviel da ergänzt werden muß und wie zahlreich und verschiedenartig die Brücken und Fäden sind, die die Mikrobiologie mit der Makrobiologie verbinden. Umfassendes Wissen, reiche Erfahrung, vollendetes didaktisches Können sind die Bedingung, unter der es so meisterhaft gelingen konnte, alle diese oft sehr verborgenen Fäden aufzufinden und an richtiger Stelle in das harmonische Gesamtbild der Mikrobiologie einzufügen, einer relativ jungen Disziplin, die als eigene Wissenschaft ja erst umgrenzt werden muß. In der neuen Auflage ist auch die neueste Literatur berücksichtigt, und es ist bewundernswert, mit welcher Klarheit bei aller Knappheit des zur Verfügung stehenden Raumes auch Abschnitte

behandelt werden, die sich auf Forschungsgebiete beziehen, die in stürmischer Entwicklung begriffen sind, wie etwa die über Antibiose und Antibiotika oder über Bakteriophagen. Allerdings kommt die Virologie kurz, wenn nicht zu kurz weg, denn auch wenn man auf dem Standpunkt steht, daß die Euviren keine Mikroorganismen sind, so wird der Leser eine ausführlichere Darstellung der Virologie in diesem Buche erwarten und vermissen, denn gerade über die Viren erfahren die Naturwissenschaftler etwa in den gangbaren Lehrbüchern der Botanik nur allzu wenig.

F. Weber (Graz).

Tischler, Georg: Allgemeine Pflanzenkaryologie. Ergänzungsband: Angewandte Pflanzenkaryologie. Fortgeführt von Heinz Dietrich Wulff. III. Lieferung. Mit 35 Textabb. S. 417—624. Berlin-Nikolassee: Gebrüder Borntraeger, 1956. Subskr.-Preis DM 39.—.

Mit dem Tode Georg Tischlers hat sich zur Bestürzung und Trauer noch die Sorge hinzugesellt, sein Monumentalwerk, die „Allgemeine Pflanzenkaryologie“, würde ein Torso bleiben. Diese Sorge ist nun geschwunden. Eine berufene Hand, Heinz Dietrich Wulff, der aus der Schule Tischlers stammt, hat es übernommen, das große Werk fort- und zu Ende zu führen. Nicht allein die Pflanzenkaryologen und die Karyologen überhaupt, sondern auch die Vertreter angewandter Disziplinen, die Berührungspunkte mit der Zellkernlehre haben, werden für die Weiterführung des Werkes dankbar sein. Die vorliegende dritte Lieferung des Ergänzungsbandes „Angewandte Pflanzenkaryologie“ ist so reich an Tatsachen, Deutungen und Ideen, daß ein Referat lediglich die Stoffgebiete anführen kann, die in dieser Lieferung behandelt werden. Es sind dies: Die Euhybriden und ihre Sterilitätsphänomene. Das Burdonen-Problem. Die Entstehung neuer Arten und Gattungen. Die Bedeutung der Chromosomenforschung für die Phylogenie. Der Ergänzungsband ist damit noch nicht abgeschlossen. Wir wünschen dem Autor, daß es ihm bald möglich sein wird, den Schlußstein zu setzen.

F. Weber (Graz).

Weibull, C.: Osmotic Properties of Protoplasts of *Bacillus megaterium*. Expt. Cell Res. 9, 294—304 (1955).

Als Protoplasten werden die durch Lysozym von ihrer Zellwand befreiten Bakterien bezeichnet. Entgegen der Angabe A. Fischers (Z. Hyg. Infektionskrankh. 1900) ist die untersuchte Art plasmolysierbar. Sie wird auf 2% DIFCO-Pepton bei 30°C in Erlenmeyer- oder Fernbach-Flaschen herangezogen. Zählungen erfolgen in Bürkerscher Zählkammer. Untersucht werden der osmotische Druck des die Protoplasten nach Lösen der Zellwand umgebenden Mediums, die Volumenveränderungen bei wechselnden Konzentrationen von Polyäthylenglykol (einem Polyglykol A 4000 vom durchschnittlichen Mol.-Gew. 3500) und von Rohrzucker und das Trockengewicht der Protoplasten in bezug auf jenes unveränderter Zellen. Die Bestimmungen des Plasmolysegrades [Ref. würde vorziehen: des Plasmorrhhysegrades] in Funktion des osmotischen Druckes der Medien weisen erneut auf eine Permeabilitätsschranke gegen jene hin (cf. Weibull, *ibid.* 9, 139—147, 1955). Zugleich informieren die Untersuchungen über die Menge osmotisch wirksamer Substanz (62% des Trockengewichts) und eines „lösungsfreien Raumes“ auch an der Bakterienzelle.

H. H. Pfeiffer (Bremen).

Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt:

Arndt, A.: Histologische und histochemische Untersuchungen über die Oogenese und bipolare Differenzierung von Süßwasser-Teleosteen	15. 5. 1955
Woochsmann, H.: Die Fällungsmetachromasie der chromotropen Substanzen der Ciliaten und Flagellaten	15. 5. 1955
Sinapius, D., und W. Schrell: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über das Cytoplasma des Aortenendothels	3. 8. 1955
Jonas, H.: A Study of the Dynamics of K^{42} Uptake by Sunflower Plants with the Aid of a Scintillation Count-Rate Meter	19. 8. 1955
Alcer, G.: Die Aufnahme von Harnstoff und Glycerin durch die Pflanzenzelle in Abhängigkeit von der Acidität der Außenlösung und des Zellsaftes	5. 9. 1955
Schoser, G.: Über die Regeneration bei den Cladophoraceen	8. 10. 1955
Turian, G.: Le corps paranucléaire des Gamètes géants d' <i>Allomyces javanicus</i> traité à l'acide borique	12. 10. 1955
Kaho, H.: Untersuchungen über die antagonistische Wirkung der Mono- und Disaccharide sowie der mehrwertigen Alkohole bei der Wirkung von Säuren auf das Pflanzenplasma (II. Mitt.)	21. 10. 1955
Meß, Eva: Kritische Untersuchungen zur kolorimetrischen Bestimmung der isoelektrischen Punkte einzelner Zellbestandteile fixierter pflanzlicher Gewebe	25. 10. 1955
Kaho, H.: Untersuchungen über die antagonistische Wirkung der Zucker und mehrwertigen Alkohole bei der Wirkung von Alkalien auf das Pflanzenplasma	21. 11. 1955
Weinmann, W. D.: Untersuchungen über die Protein- und Nukleinsäurefraktionen des Zellkernes	21. 11. 1955
Keller, R.: Elektropolare Farbstoffe im elektrischen Organ	25. 11. 1955
Thielke, Charlotte: Gerbstoffidioblasten in der Scheide von <i>Carex</i>	6. 12. 1955
Freytag, K.: Optik und Feinbau der Schleimzellen in den Knollen verschiedener <i>Orchis</i> -Arten	14. 12. 1955
Badenhuizen, N. P., and R. W. Dutton: Growth of ^{14}C -labelled Starch Granules in Potato Tubers as Revealed by Autoradiographs	17. 12. 1955
Kaja, H.: Untersuchungen über Struktur und Entwicklung der Leukoplasten in der Epidermis von <i>Chlorophytum comosum</i> (Thunb.) Bak.	16. 1. 1956
Wiercinski, F. J.: The Microinjection of Adenosine Triphosphate into the Protoplasm of Skeletal Muscle Fibers	18. 1. 1956
Wartenberg, A.: Über Kataphoreseversuche mit Hefezellen. I. Die Wanderungsrichtung in der Kataphorese	4. 3. 1956
Wartenberg, A.: Über Kataphoreseversuche mit Hefezellen. II. Die Wanderungsgeschwindigkeit in der Kataphorese	4. 3. 1956
Günther, Elisabeth: Der Einfluß chemischer und physikalischer Faktoren auf die protoplasmatischen Eigenschaften isolierter <i>Elodea</i> -Blätter unter besonderer Berücksichtigung der Zusammenhänge zwischen Wachstumsphase und Plasmaviskosität	7. 3. 1956
Erdmann, K.: Zusammenhänge zwischen reduzierenden Eigenschaften und Schutzwirkung von SH-Verbindungen gegen Strahlen	10. 3. 1956
Millčić, D.: Virus-Zelleinschlüsse in <i>Alliaria officinalis</i>	22. 3. 1956
Umrath, K.: Elektrische Messungen und Reizversuche an <i>Amoeba proteus</i>	30. 3. 1956
Drawert, H., und Ingeborg Metzner: Untersuchungen zur vitalen Fluorochromierung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot	3. 4. 1956
Butterfass, Th.: Modellversuche zur Beeinflussung der Diffusion eines Fluorochroms als Anzeiger des Wasserwegs in pflanzlichen Kapillaren	9. 4. 1956
Butterfass, Th.: Fluoroskopische Untersuchungen an Keulenhaaren von <i>Vicia faba</i> L. und <i>Phaseolus coccineus</i> L.	9. 4. 1956
Schleep, W.: Beiträge zur Physiologie der Pigmentbildung in belichteten etiolierten Blättern	9. 4. 1956

SPRINGER-VERLAG IN WIEN I

Protoplasmatologia

Unter Mitwirkung hervorragender internationaler Fachleute

herausgegeben von

Prof. Dr. **L. V. Heilbrunn** und Prof. Dr. **F. Weber**
Philadelphia Graz

In 14 Bänden

Das Handbuch erscheint in selbständigen Einzelveröffentlichungen, die in kurzen Zeitabständen aufeinanderfolgen und zu Bänden vereinigt werden. Jeder selbständig erscheinende Handbuchteil ist einzeln käuflich. Über die Disposition des Gesamtwerkes und die nächsten Veröffentlichungen gibt der Verlag bereitwilligst Auskunft.

Bei Verpflichtung zur Abnahme des gesamten Handbuchs gilt der Vorbestellpreis als Subskriptionspreis weiter.

In Kürze werden erscheinen:

Biocolloids and Their Interactions. By Prof. Dr. H. G. Bungenberg de Jong, and Dr. H. L. Boolj, both Laboratorium voor Medische Chemie der Rijksuniversiteit Leiden, Holland. With 159 figures. Approx. 170 pages. Gr.-8°. 1956. (Band I/2.)

Vorbestellpreis, gültig bis zum Erscheinen

S 252.—, DM 42.—, sfr. 43.—, \$ 10.—

Endgültiger Ladenpreis nach Erscheinen

S 312.—, DM 52.—, sfr. 53.30, \$ 12.40

Metachromasy in Animal Cells. By Prof. Dr. John W. Kelly, Anatomy Department, Virginia College of Medicine, Richmond, Va., U.S.A. With 5 figures. Approx. 110 pages. Gr.-8°. 1956. (Band II/D/2.)

Vorbestellpreis, gültig bis zum Erscheinen

S 168.—, DM 28.—, sfr. 28.60, \$ 6.65

Endgültiger Ladenpreis nach Erscheinen

S 210,—, DM 35,—, sfr. 35.90, \$ 8.35

Le vacuome de la cellule végétale. Morphologie. Par Pierre Dangeard, Professeur à la Faculté des Sciences, Laboratoire de Botanique, Université de Bordeaux. **Le vacuome animal.** Par Raymond Hovasse, Professeur à la Faculté des Sciences de Clermont-Ferrand, France. **Contractile Vacuoles of Protozoa.** By Prof. Dr. J. A. Kitching, Department of Zoology, University of Bristol. **Food Vacuoles.** By Prof. Dr. J. A. Kitching, Department of Zoology, University of Bristol. With 86 figures. Approx. 220 pages. Gr.-8°. 1956. (Band III/D/12/3a/3b).

Vorbestellpreis, gültig bis zum Erscheinen

S 324.—, DM 54.—, sfr. 55.25, \$ 12.85

Endgültiger Ladenpreis nach Erscheinen

S 402.—, DM 67.—, sfr. 68.80, \$ 16.—

Zu beziehen durch jede Buchhandlung

